

Univerzita Karlova v Praze
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie
Studijní obor: Mikrobiologie



Bc. Leona Zieglerová

**Vliv exprese *vanZ_{Tei}* a *vanZ_g* na rezistenci ke glykopeptidovým antibiotikům
u *Staphylococcus aureus***

**The effect of *vanZ_{Tei}* and *vanZ_g* expression on resistance to glycopeptide
antibiotics in *Staphylococcus aureus***

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Školitel: Mgr. Gabriela Balíková Novotná, Ph. D.

Praha, 2015

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 03. 05. 2015

Leona Zieglerová

Poděkování:

Chtěla bych poděkovat nejprve své školitelce Mgr. Gabriele Novotné, Ph. D. za cenné rady, připomínky, trpělivost a vlídný přístup při vedení této práce. Velké poděkování též patří Vladimíru Vimbergovi, Ph. D. za užitečné rady k experimentální části práce a udržování pozitivní nálady v pracovním kolektivu Laboratoře biologie sekundárního metabolismu Mikrobiologického ústavu AV ČR ve Vestci, na které se dále podíleli Mgr. Jakub Lenart, Bc. Lída Veselá, Mgr. Jana Veselá a Mgr. Markéta Koběřská, Ph. D. a také kolegové z naší laboratoře v Krči. Dále bych chtěla poděkovat doktorovi Janu Svobodovi a jeho kolegům ze střediska cytometrie a mikroskopie MBÚ ČR za odbornou pomoc s prací na konfokálním mikroskopu. Poděkování patří i mým rodičům, přátelům a přítelovi za podporu ve studiu.

Abstrakt

Membránový protein VanZ_{Tei}, který je kódován genem *vanZ* z *vanA* glykopeptidového rezistenčního genového klastru je součástí velké rodiny VanZ proteinů. VanZ_{Tei} udílí rezistenci k teikoplaninu u *Enterococcus faecalis* a to nezávisle na přítomnosti dalších proteinů kódovaných klastrem. Náplní práce bylo porovnat schopnost dvou ortologních proteinů VanZ_{Tei} a VanZ_g (z genomické DNA *Enterococcus faecium*) udílet rezistenci ke glykopeptidům u *Staphylococcus aureus* RN4220 a u *Enterococcus faecium*.

Bylo zjištěno, že VanZ_g 8-16 krát zvyšuje rezistenci k teikoplaninu (Tei) a udílí 8 krát větší rezistenci k dalbavancinu (Dalb). VanZ_{Tei} také udílí rezistenci k Tei i Dalb, ale zvýšení rezistence je jen dvojnásobné. Naopak VanZ_{Tei} udílí v porovnání s VanZ_g účinněji rezistenci k nově syntetizovaným glykopeptidovým antibiotikům (čtyřnásobné zvýšení rezistence pro VanZ_{Tei} a 2-4 násobné zvýšení rezistence pro VanZ_g). To naznačuje, že oba proteiny mají rozdílnou specifitu k antibiotikům. Přesto byly vyselektovány mutanty *S. aureus* RN4220 VanZ_{Tei} pRMC2 se zvýšenou rezistencí k teikoplaninu (MIC_{Tei} > 8 µg/ml) u nichž je rezistence závislá na expresi *vanZ_{Tei}*. Tyto rezistentní mutanty nenesou mutaci v genu *vanZ_{Tei}* ani v jeho ribozomálním vazebném místě. Ani jeden z proteinů neudílí rezistenci k vankomycinu a k jiným neglykopeptidovým antibiotikům.

Klíčová slova: rezistence k antibiotikům, teikoplanin, vankomycin, glykopeptidy, mechanismus rezistence, *vanZ*, *vanJ*, *Enterococcus sp.*, *Staphylococcus aureus*, *Streptomyces coelicolor*, rezistentní mutanty, fluorescenční mikroskopie

Abstract

A membrane protein VanZ_{Tei} which is encoded by the gene *vanZ* from the *vanA* glycopeptide resistance gene cluster is a part of the large family of VanZ proteins. VanZ_{Tei} confers resistance to teicoplanin in *Enterococcus faecalis* without the presence of other proteins encoded by the cluster. The aim of my work was to compare the ability of two orthologous proteins VanZ_{Tei} and VanZ_g (from the genome of *Enterococcus faecium*) to confer resistance to glycopeptides in *Staphylococcus aureus* RN4220 and *Enterococcus faecium*.

We have shown that VanZ_g increases resistance to teicoplanin (Tei) 8 to 16 times the and also to dalbavancin (Dalb) 8 times. VanZ_{Tei} also confers resistance to Tei and Dalb, but the increase is only twofold. Conversely VanZ_{Tei} confers resistance to newly synthesized glycopeptides more effectively than VanZ_g (fourfold increase of resistance conferred by VanZ_{Tei} and two to fourfold increase of resistance conferred by VanZ_g). It suggests that both proteins have different specificity to antibiotics. In despite the mutants of *S. aureus* RN4220 VanZ_{Tei} pRMC2 with increased resistance to teicoplanin (MIC_{Tei} > 8 µg/ml) in which the resistance is dependent on *vanZ_{Tei}* expression were selected. These resistant mutants do not carry mutation in a gene *vanZ_{Tei}* or in its ribosomal binding site. Neither of the proteins do not confer resistance to vancomycin and other non-glycopeptide antibiotics.

Key words: antibiotic resistance, teicoplanin, vancomycin, glycopeptides, mechanism of resistance, *vanZ*, *vanJ*, *Enterococcus* sp, *Staphylococcus aureus*, *Streptomyces coelicolor*, resistant mutants, fluorescence microscopy

Seznam zkratek

ABSSSI	akutní bakteriální kožní a strukturní infekce
AK	aminokyselina
ATB	antibiotikum
bp	párů bází
cSSSI	komplikované kožní a strukturní infekce
CWSS	ochranný stresový systém buněčné stěny
Da, kDa	Dalton, kiloDalton
D-Ala-D-Ala	D-alanin-D-alanin
D-Ala-D-Met	D- alanin-D-methionin
D-Ala-D-Phe	D-alanin-D-fenylalanin
Ddl	D-Ala-D-Ala ligáza
DIC	diferenciální interferenční kontrast
DNA	deoxyribonukleová kyselina
dNTP	deoxynukleotidtrifosfát
FL	fluorescenční
GISA	<i>Staphylococcus aureus</i> s mírnou úrovní rezistence ke glykopeptidovým antibiotikům
GRSA	<i>Staphylococcus aureus</i> rezistentní ke glykopeptidovým antibiotikům
his tag	6 histidinových zbytků
LSM	laser skenovací mikroskopie
MIC	minimální inhibiční koncentrace
MRSA	methicili-rezistentní <i>Staphylococcus aureus</i>
NRPS	neribozomální peptid syntetáza
OD	optická denzita
ORF	otevřené čtecí rámce
PBP	penicilin vazebný protein
PCR	polymerázová řetězová reakce
RBS	ribozom vazebné místo
rpm	otáčky za minutu
SD	Shine Dalgarno
UDP	undekaprenol

VISA	<i>Staphylococcus aureus</i> s mírnou úrovní rezistence k vankomycinu
TISA	<i>Staphylococcus aureus</i> s nízkou úrovní rezistence k teikoplaninu
VRE	vankomycin-rezistentní enterokokové
VRSA	vankomycin-rezistentní <i>Staphylococcus aureus</i>

Obsah

Abstrakt	4
Abstract.....	5
Seznam zkratek	6
1 Úvod.....	10
2 Cíle práce.....	12
3 Přehled literatury.....	13
3.1 Glykopeptidová antibiotika	13
3.1.1 Struktura a biosyntéza.....	15
3.1.2 Mechanismus působení glykopeptidových antibiotik	16
3.1.3 Glykopeptidová antibiotika první generace	18
3.1.4 Deriváty vankomycinu	20
3.1.5 Deriváty teikoplaninu	21
3.2 Rezistence ke glykopeptidovým antibiotikům	22
3.2.1 Základní rezistenční mechanismus	23
3.2.2 Další typy rezistenčních mechanismů	30
4 Materiál a metody	35
4.1 Materiál	35
4.1.1 Bakteriální kmeny	35
4.1.2 Vektory	35
4.1.3 Kultivační média	36
4.1.4 Oligonukleotidy	37
4.1.5 Enzymy.....	38
4.1.6 Roztoky a pufrы	38
4.1.7 Použité chemikálie	39
4.1.8 Komerční soupravy a standardy	41
4.1.9 Počítačová analýza	41
4.2 Metody	42
4.2.1 Bioinformatická analýza	42
4.2.2 Kultivace a uchovávání bakterií	42
4.2.3 Příprava a transformace do kompetentních buněk.....	43
4.2.4 Polymerázová řetězová reakce PCR.....	45
4.2.5 Elektroforéza DNA v agarózovém gelu.....	46
4.2.6 Izolace DNA.....	46
4.2.7 Štěpení DNA fragmentů pomocí restrikčních endonukleáz	47

4.2.8	Ligace upravených inzertů do pRMC2.....	47
4.2.9	Sekvenování DNA	48
4.2.10	Stanovení citlivosti na antimikrobiální látky.....	48
4.2.11	Testování aktivity fúzních proteinů VanZ _{Tei} <i>his tag</i> a VanZ _g <i>his tag</i>	49
4.2.12	Mikroskopie	50
5	Výsledky	52
5.1	Bioinformatická analýza – predikce proteinů VanZ _{Tei} a VanZ _g , sekvenční analýza....	52
5.1.1	Srovnávací aligment VanZ _g a VanZ _{Tei}	52
5.1.2	Sekundární struktura a membránová topologie	53
5.1.3	Predikce oblastí proteinů VanZ _{Tei} a VanZ _g důležitých pro funkci.....	55
5.1.4	VanZ _g variabilita a genomický kontext	57
5.1.5	Fylogenetická analýza VanZ podobných proteinů	58
5.2	Příprava konstruktů pro expresi ve <i>Staphylococcus aureus</i> RN4220, <i>Enterococcus faecium</i> E1162	60
5.2.1	Příprava vektoru.....	60
5.2.2	Transformace konstruktů do <i>Staphylococcus aureus</i> RN4220 a <i>Enterococcus faecium</i> E1162 a ověření transformant	61
5.3	Rezistenční fenotyp udílený geny vanZ _{Tei} a vanZ _g	63
5.4	Vliv exprese genů vanZ _{Tei} a vanZ _g na vazbu fluorescenčně značených glykopeptidů na buňky.....	64
5.5	Selekce <i>S. aureus</i> RN4220 VanZ _{Tei} pRMC2 mutant rezistentních k teikoplaninu	69
5.6	Testování aktivity fúzních proteinů VanZ _{Tei} <i>his tag</i> a VanZ _g <i>his tag</i>	71
6	Diskuze	75
7	Souhrn.....	82
8	Seznam použité literatury	84

1 Úvod

Objev antibiotik znamenal pro lidskou populaci velký krok vpřed v léčbě nejrůznějších infekcí. Jedná se však jen o dílčí úspěch v boji proti infekcím, jelikož bakterie dokázaly využít své schopnosti přizpůsobit se stresovým podmínkám v prostředí (mezi něž patří i selekční tlak antibiotik). To spočívá ve schopnostech bakterie získávat nové výhodné vlastnosti i z nepříbuzného organismu pomocí horizontálního přenosu genetické informace nebo na základě krátké replikační doby selektovat výhodné mutace. Což jim umožňuje nejen přežívat nepříznivé podmínky, ale vyvíjet nové rezistenční mechanismy proti antibiotikům. Porozumění mechanismu vývoje rezistence k používaným antibiotikům je důležitým aspektem pro hledání nového účinného antibiotika.

Glykopeptidová antibiotika jsou využívána proti infekcím způsobených gram-pozitivními bakteriemi, které jsou obvykle rezistentní či málo citlivé k dalším antibiotikům. Jevila se jako ideální antibiotika, jelikož inhibují poslední krok syntézy peptidoglykanu vazbou na koncový dipeptid D-alanyl-D-alanin peptidoglykanového prekurzoru. Dlouhou dobu byla glykopeptidová antibiotika také řazena mezi antibiotika poslední volby, ale po dvaceti letech si i k nim začaly bakterie vyvíjet obranné a rezistenční mechanismy. Rezistence ke glykopeptidovým antibiotikům byla poprvé zaznamenána u enterokoků a je spojena s přítomností *van* rezistenčního genového kladru, který může mít několik fenotypových podob. Podstatou rezistenčního mechanismu je syntéza modifikovaného peptidoglykanového prekurzoru, který obsahuje, místo koncového dipeptidu D-Ala-D-Ala, dipeptid D-Ala-D-laktát nebo D-Ala-D-serin. Glykopeptidová antibiotika se k modifikovanému peptidoglykanovému prekurzoru váží s nižší afinitou a jsou tedy méně účinná.

Toto ovšem není jediný možný únik před účinky glykopeptidových antibiotik. U *Staphylococcus aureus* byl zjištěn pokles citlivosti ke glykopeptidovým antibiotikům z důvodu různých mutací především ve dvousložkových regulačních systémech reagujících na poškození buněčné stěny, které vedou k různým fyziologickým změnám ve stavbě buněčné stěny a tím je bráněno glykopeptidům difundovat k cíli svého působení. Mechanismus těchto složitých regulačních procesů vedoucích k ochraně bakterie nejsou dosud zcela objasněny.

Dalším neobjasněným mechanismem vzniku rezistence ke glykopeptidovým antibiotikům, zvláště teikoplaninu je způsoben expresí *vanZ* genu, který udílí rezistenci k teikoplaninu u *Enterococcus faecalis* bez přičinění dalších genů z rezistenčního kladru (Arthur et al., 1995). Ačkoliv *vanZ* gen se nachází na *vanA* rezistenčním genovém kladru. Mechanismus jeho funkce není znám a v současnosti se jedná o jediného částečně charakterizovaného zástupce velké rodiny VanZ proteinů. Podobně jako gen *vanZ* byl

charakterizován gen *vanJ* u nepatogenní bakterie *Streptomyces coelicolor*, jehož exprese je zodpovědná za rezistenci k teikoplaninu a z něj odvozeným derivátům (Novotná et al., 2012). Potenciální přenos těchto genů do jiných bakterií by mohl mít za následek vznik rezistentních kmenů. Předvídavost takových procesů a zjištění potenciální hrozby může dát lidstvu potenciální náskok v boji ještě před vznikem nové rezistentní infekce a také může být zdrojem nových poznatků o mechanismu rezistence.

2 Cíle práce

Hlavním cílem mé diplomové práce bylo porovnání vlivu exprese dvou ortologních genů (*vanZ_{Tei}* a *vanZ_g*) na rezistenci ke glykopeptidovým antibiotikům a pokusit se přispět k objasnění mechanismu rezistence k teikoplaninu udílený genem *vanZ_{Tei}*. Jelikož jedinou známou skutečností je, že *vanZ_{Tei}* udílí svou expresí rezistenci k teikoplaninu nezávisle k mechanismu rezistence udíleného zbytkem rezistenčního klastru. K hlavnímu cíli bylo směřováno pomocí dílčích cílů, jež spočívaly v následujících krocích:

- Připravit konstrukty, které by umožňovaly kontrolovatelnou indukci exprese genů *vanZ_{Tei}* a *vanZ_g* v heterologních hostitelích *Staphylococcus aureus* RN4220 a *Enterococcus faecium* E1162.
- Stanovit rezistenční fenotyp udílený proteiny VanZ_{Tei} a VanZ_g.
- Analyzovat vliv exprese *vanZ* genů na fyziologické změny v buňce projevující se rozlišnou vazbou antibiotik v rezistentních a citlivých kmenech.
- Připravit konstrukty exprimující proteiny fúzované s histidinovou kotvou umožňující imunodetekci proteinů pro analýzu exprese a membránové topologie.

3 Přehled literatury

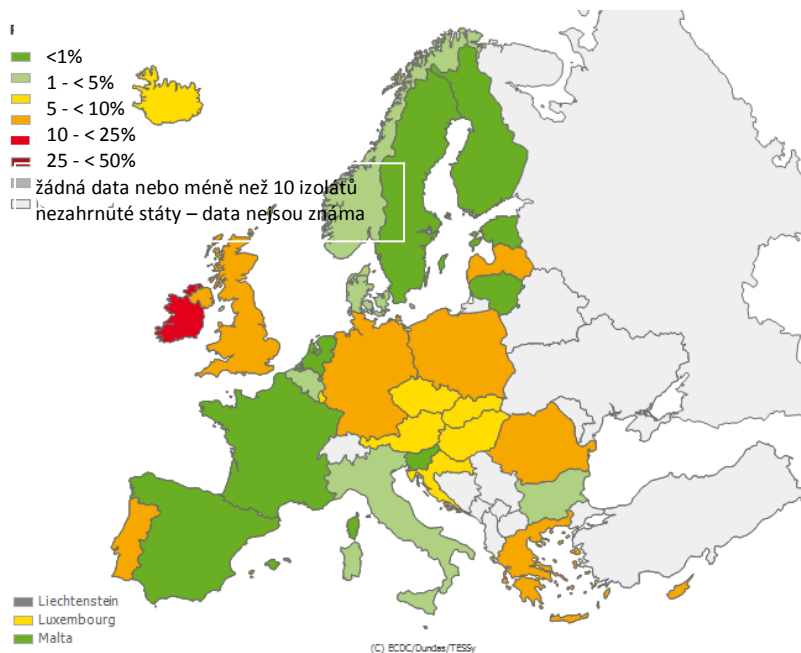
3.1 Glykopeptidová antibiotika

První glykopeptidové antibiotikum vankomycin, byl vyizolován v 60. letech 20. století ze *Streptomyces orientalis*. Teikoplanin produkovaný *Actinoplanes teichomyceticus* byl objeven o dvacet let později. Z důvodu velké toxicity se zpočátku využívaly zřídka, můžou způsobit nekrózu tkáně či zánět žil a mají mnoho dalších vedlejších účinků. Indikovány byly pouze pro vážně nemocné s nesnášenlivostí na β -laktamy či proti rezistentním kmenům k β -laktamům. Avšak s nárustem výskytu rezistencí se glykopeptidy staly důležitými antibiotiky poslední volby pro léčbu infekcí způsobených methicilin - rezistentními kmeny *Staphylococcus aureus* (Binda et al., 2014; Van Bambeke, 2006; Yim et al., 2014).

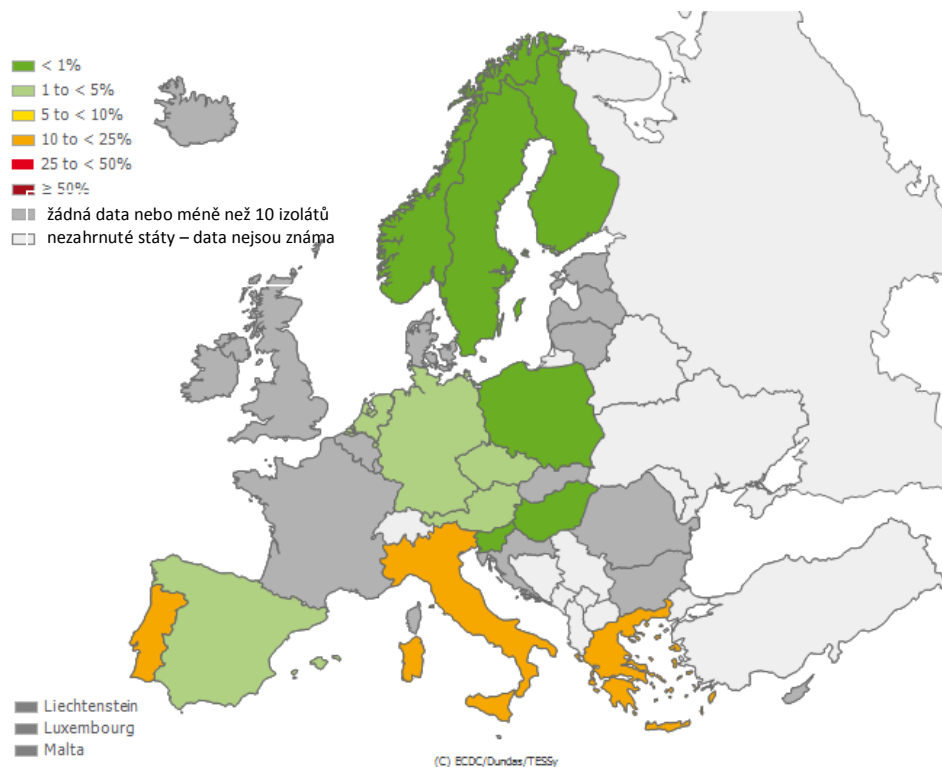
Spektrum účinku glykopeptidů je úzké, působí pouze proti gram-pozitivním bakteriím, zejména proti gram-pozitivním kokům (enterokoky a stafylokoky) a proti několika anaerobním bakteriím jako např. *Clostridium difficile*. Inhibují časnou fázi syntézy peptidoglykanu při tvorbě buněčné stěny, čímž se odlišují od β -laktamů. Mají bakteriostatický účinek a v některých případech, pokud jsou kombinovány s aminoglykosidy či β -laktamy i účinek pomalý baktericidní (Eliopoulos and Eliopoulos, 1988).

Jelikož 20 let byla glykopeptidová antibiotika hojně používána proti enterokokům rezistentním na β -laktamy a proti methicilin-rezistentním *Staphylococcus aureus* (MRSA) vznikly nejprve kmeny enterokoků rezistentních k vankomycinu (VRE). A později se i u stafylokoků vyskytly kmeny méně citlivé na vankomycin (VISA) a dokonce i kmeny rezistentní k vankomycinu (VRSA). Podobný vývoj výskytu rezistence proběhl i u teikoplaninu. Rezistentní kmeny nebo kmeny se sníženou citlivostí se vyskytují v nemocnicích nejčastěji u dlouhodobě hospitalizovaných pacientů. Právě u dlouhodobě léčených pacientů byly zaznamenávány první rezistentní nebo méně citlivé kmeny (Uttley et al., 1989; Van Bambeke, 2006; Yim et al., 2014). Výskyt vankomycin-rezistentních enterokoků v Evropě je zvláště pro *Enterococcus faecium* alarmující. Jelikož za 12 let VRE *faecium* se rozšířil do států, kde v roce 2001 nebylo zjištěno ani deset rezistentních izolátů. Ve státech, kde byl již v roce 2001 zaznamenán VRE izolát, došlo do roku 2013 k navýšení výskytu (v některých státech došlo dokonce k dramatickému navýšení) a pouze v několika málo případech bylo zaznamenáno snížení výskytu (Obr. 1 a Obr. 2)¹. Z těchto poznatků vyplývá, že je nezbytné nalézt nová účinnější glykopeptidová antibiotika, která budou mít lepší vlastnosti než původní glykopeptidová antibiotika, vankomycin a teikoplanin.

Obrázek 1 Mapa ukazující výskyt vankomycin-rezistentních izolátů *Enterococcus faecium* v Evropě zaznamenaných v roce 2013. – převzato z internetových stránek European centre for disease prevention and control¹.



Obrázek 2 Mapa ukazující výskyt vankomycin-rezistentních izolátů *Enterococcus faecium* v Evropě zaznamenaných v roce 2001. – převzato z internetových stránek European centre for disease prevention and control¹.



¹ <http://ecdc.europa.eu/en/Pages/home.aspx>

Mnoho studií se zabývá hledáním výhodných vlastností pro glykopeptidové antibiotikum, které jej zvýhodní před obrannými mechanismy bakterie a bude účinnější než v přírodě syntetizovaná antibiotika. Jednou z výhodných vlastností mají například karbohydráty vankomycinu, které přímo interagují s bakteriálními proteiny zahrnutými v transglykosylačních krocích syntézy buněčné stěny, čímž by se funkčně odlišují od vankomycinu (Ge et al., 1999). První studie o interakci hydrofóbních vankomycinů s proteiny bakteriální membrány z *Escherichia coli* popisuje Roy et al. Bylo zjištěno, že pravděpodobně díky N-alkylové hydrofobní části zůstávají glykopeptidy účinné proti vankomycin-rezistentním kmenům (Roy et al., 2001). Právě biosyntetické úpravy glykopeptidových antibiotik první generace můžou změnit biologickou a chemickou aktivitu nově syntetizovaných antibiotik. Přidat jim výhodnější vlastnosti a lepší účinnost v boji proti bakteriím včetně rezistentních kmenů.

3.1.1 Struktura a biosyntéza

Všechna glykopeptidová antibiotika jsou složena z heptapeptidu, jehož peptidová struktura se může lišit dle typu antibiotika. Tento heptapeptid je glykosylován nebo různě modifikován (např. lipidový postranní řetězec, chlorace, acetylace,...). Glykopeptidová antibiotika můžou být řazena do dvou skupin podle peptidové struktury, která se liší u vankomycinu a teikoplaninu počtem aromatických kyselin. Peptidový řetězec vankomycinu je složen z těchto aminokyselin: 1. leucin, 2. β - hydroxytyrosin, 3. asparagin, 4. 4 - hydroxyfenylglycin, 5. 4 - hydroxyfenylglycin, 6. β - hydroxytyrosin, 7. 3,5 - dihydroxyfenylglycin. Peptidový řetězec teikoplaninu je složen z následujících aminokyselin: 1. 4- hydroxyfenylglycin, 2. β - hydroxytyrosin, 3. 3,5 - dihydroxyfenylalanin, 4. 4 - hydroxyfenylglycin, 5. 4 - hydroxyfenylglycin, 6. β - hydroxytyrosin, 7. 3,5 - dihydroxyfenylalanin. U vankomycinu na pozicích 1. a 3. nejsou aromatické aminokyseliny narozdíl od teikoplaninu. Podle rozdílnosti v heptapeptidové struktuře vankomycinu a teikoplaninu jsou rozdělována i ostatní glykopeptidová antibiotika. Ti co obsahují nearomatické aminokyseliny na 1. a 3. pozici, se přiřazují k vankomycinu a jemu podobným derivátům (chloroeremomycin, balhimycin). Ti co obsahují aromatické AK na 1. a 3. pozici se řadí mezi teikoplanin a jemu podobným derivátům (ristocetin A, A47934). Na ostatních pozicích heptapeptidu jsou vždy zbytky aromatických kyselin. Díky tomu existuje rozdíl v počtu propojujících oxidačních vazeb. U vankomycinu jsou pouze tři a u teikoplaninu čtyři. Z tohoto důvodu teikoplanin s cílem svého působení vytváří zvláštní konformační strukturu tzv. vazebnou kapsu a vankomycin nikoliv (Binda et al., 2014).

Heptapeptidy jsou syntetizované neribozomální peptid - syntetázou (NRPS). NRPS je multimodulární komplex, jehož jeden modul syntetizuje právě jednu aminokyselinu, primární sekvence peptidu je určena dalšími NRPS moduly. Každý NRPS modul obsahuje kondenzační, adenylační, thiolovou, epimerizační a thioesterázovou doménu. Kondenzační, adenylační a thiolové domény jsou nezbytné pro každý modul, zatímco epimerizační a thioesterázová doména jsou modifikační domény a vyskytují se jen v některých modulech. Thioesterázová doména ukončuje syntézu a štěpí peptidový řetězec z NRPS sbalování (Pootoolal et al., 2002; Marahiel and Essen, 2009).

3.1.2 Mechanismus působení glykopeptidových antibiotik

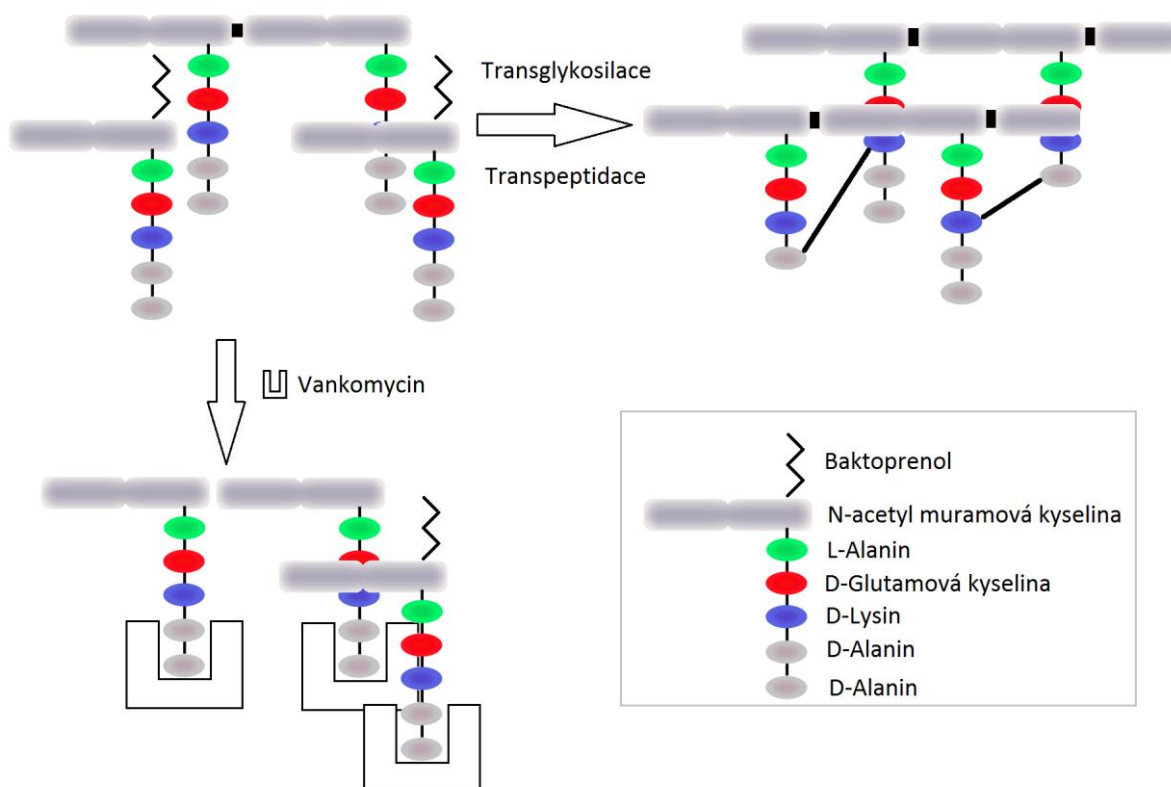
Antibiotika lze dle mechanismu účinku rozdělit do čtyř skupin. První skupinou jsou antibiotika inhibující biosyntézu buněčné stěny – např. glykopeptidová antibiotika, β -laktamová antibiotika. Druhou skupinou jsou antibiotika, která inhibují proteosyntézu - např. aminoglykozidy, chloramfenikol, makrolidy, tetracykliny. Třetí skupina antibiotik inhibuje DNA replikaci – např. rifampicin, chinolony, sulfonamidy. Poslední skupina antibiotik poškozuje a brání správné funkci cytoplazmatické membrány – např. amfotericin B, azoly, polyeny, polymyxiny.

Glykopeptidová antibiotika spadají do skupiny antibiotik, které inhibují biosyntézu buněčné stěny. Buněčná stěna je odlišná pro gram-negativní a gram-pozitivní bakterie. Základní stavební složku, ale obsahují oba typy bakterií, propojené polyméry peptidoglykanu. Peptidoglykan (známý také pod názvem murein) je složen z dlouhých řetězců dvou aminosacharidů (z N-acetylglukosaminu a z N-acetylmuramové kyseliny) spojených přes β 1-4 glykosidickou vazbou. Na každé N-acetylmuramové kyselině je navázán krátký peptidový substituent složený z pěti aminokyselin. Pro gram pozitivní bakterie to jsou tyto aminokyseliny: L-alanin, D- glutamová kyselina, L-lysin (občas meso – diaminopimelová kyselina) D-alanin, D-alanin. Při spojování peptidoglykanových molekul je poslední D-Ala odštěpen a D-Ala na 4. místě v peptidu je spojen pomocí transpeptidázy s amino skupinou na 3. AK na sousedním peptidovém vlákne další N-acetylmuramové kyseliny. U *S. aureus* je spojení peptidoglykanových molekul uskutečněno pomocí mostu tvořeného pěti glyciny. Biosyntézu buněčné stěny můžeme rozdělit do tří kroků. Prvním krok se odehrává v cytoplasmě a vede k syntéze prekurzorů (spojení cukru a nukleotidu) UDP – N-acetylmuramylpentapeptidů a UDP – N – acetylglukosaminů. Druhý krok probíhá na cytoplazmatické membráně, kde je syntetizován lipid I. Lipid I je syntetizován díky membránovému akceptoru baktoprenolu jenž na sebe váže fosfo- N-

acetylmuramylpentapeptidovou skupinu z UDP-N-acetylmuramylpeptidu. Tím vzniká lipid I, což je komplex [N-acetylmuramylpentapeptidu - fosforyl - undekaprenol]. Na lipid I se naváže N-acetylglukosamin z prekursoru UDP-N-acetylglukosaminu a vzniká lipid II. Lipid II je substrátem reakcí, které vedou k polymerizaci peptidoglykanů, což je třetí krok biosyntézy buněčné stěny. Třetí krok biosyntézy probíhá na vnější straně plazmatické membrány a je katalyzován penicilin vazebnými proteiny, které katalyzují transglykosylační a transpeptidační reakce, které vytváří glykosidické a peptidické vazby mezi peptidoglykany (Scheffers and Pinho, 2005).

Glykopeptidová antibiotika inhibují třetí fázi syntézy peptidoglykanu, interagují s jeho peptidoglykanovým prekurzorem, který nevstoupil do transglykosylační a transpeptidační reakce. Prvotním cílem vankomycinu je konec D-Ala-D-Ala peptidoglykanového prekurzoru (Obr. 3). Peptidylová část vankomycinu vytváří komplex s D-Ala-D-Ala dipeptidem přes vodíkové můstky. Díky tomu zabraňuje enzymu penicilin vazebným proteinům nasednout na svůj substrát. Intenzita interakce lze zvýšit dvěma mechanismy: 1. tvorbou homodiméru mezi glykopeptidovým antibiotikem (vankomycin, eremomycin, chloroeremomycin. Diméry dávají struktuře rigidní charakter, který uzavírá vazebnou kapsu do správné konformace. 2. kotvením antibiotik v membráně, stejně jako glykopeptidy nesoucí lipofilní konec (ramoplanin, teikoplanin, dalbavancin). Což umožňuje bližší kontakt s cytoplazmatickou membránou a oni můžou vázat svůj biologický cíl (Van Bambeke et al., 2004). Výsledkem tohoto působení je nestabilita růstu a pevnosti buněčné stěny, která vede k zastavení buněčného dělení a oslabení buněčné stěny, jenž končí buněčnou smrtí. Tento mechanismus účinku glykopeptidových antibiotik je tak velice účinný a myslelo se, že mu bakterie nemůžou uniknout klasickými rezistenčními mechanismy.

Obrázek 3 Mechanismus působení glykopeptidového antibiotika na syntézu buněčné stěny – převzato a upraveno od Lessard and Walsh, 1999

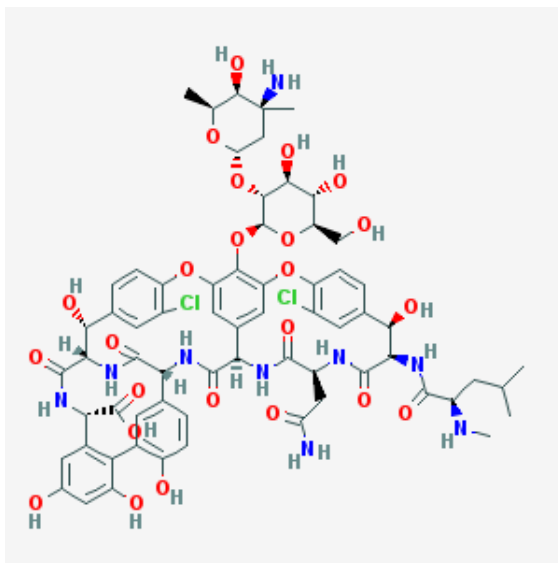


3.1.3 Glykopeptidová antibiotika první generace

3.1.3.1 Vankomycin

Vankomycin má na své heptapeptidové kostře popsané v kap. 3. 1. 1 navázán na čtvrté aminokyselině disacharid složený z D-glukózy a L-vankosaminu (Obr. 4). Na 2. a 6. pozici heptapetidu jsou chlorované β -hydroxytyrosiny. Vankomycin má schopnost vytvářet diméry a tím zvyšuje vazebnou afinitu k cíli svého působení (Beauregard et al., 1995). Z jeho základní struktury vychází i nově syntetizovaná antibiotika: oritavancin a telavancin.

Obrázek 4 Chemická struktura vankomycinu – Zdroj: PubChem, NCBI

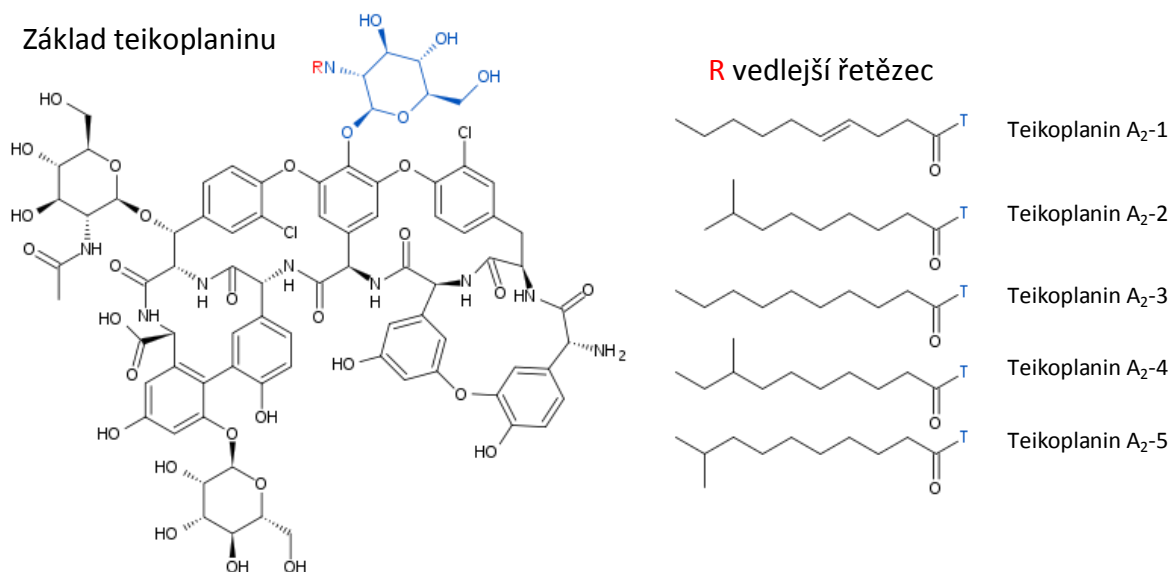


3.1.3.2 Teikoplanin

Teikoplanin (Obr. 5) má na aminokyselinových pozicích 4, 6 a 7 navázány tři monosacharidy. Na čtvrté pozici je připojen β -D-glukosamin, ke kterému je připojen řetězec mastné kyseliny. Klinicky používaný teikoplanin je směsí pěti různých lipoglykopeptidových molekul lišících se v délce a větvení zbytku mastné kyseliny (Obr. 5). Šestá aminokyselina je glykosylována N-acetylglukosaminem a na sedmé AK se vyskytuje manóza. β -hydroxytyrosiny na druhé a šesté pozici, stejně jako u vankomycinu, nesou kovalentně navázané dva atomy chlóru.

Teikoplanin nemá schopnost vytvářet diméry, ale k lepší interakci s dipeptidovým koncem D-Ala-D-Ala využívá ve své struktuře zabudovaný vedlejší řetězec mastné kyseliny. Lipidový konec může fungovat jako membránová kotva a tím se teikoplanin dostává do těsného kontaktu s cílem svého působení (Barna et al., 1984).

Obrázek 5 Chemická struktura teikoplaninu s výčtem podob vedlejších řetězců - Zdroj: <http://en.wikipedia.org/wiki/Teikoplanin>



3.1.4 Deriváty vankomycinu

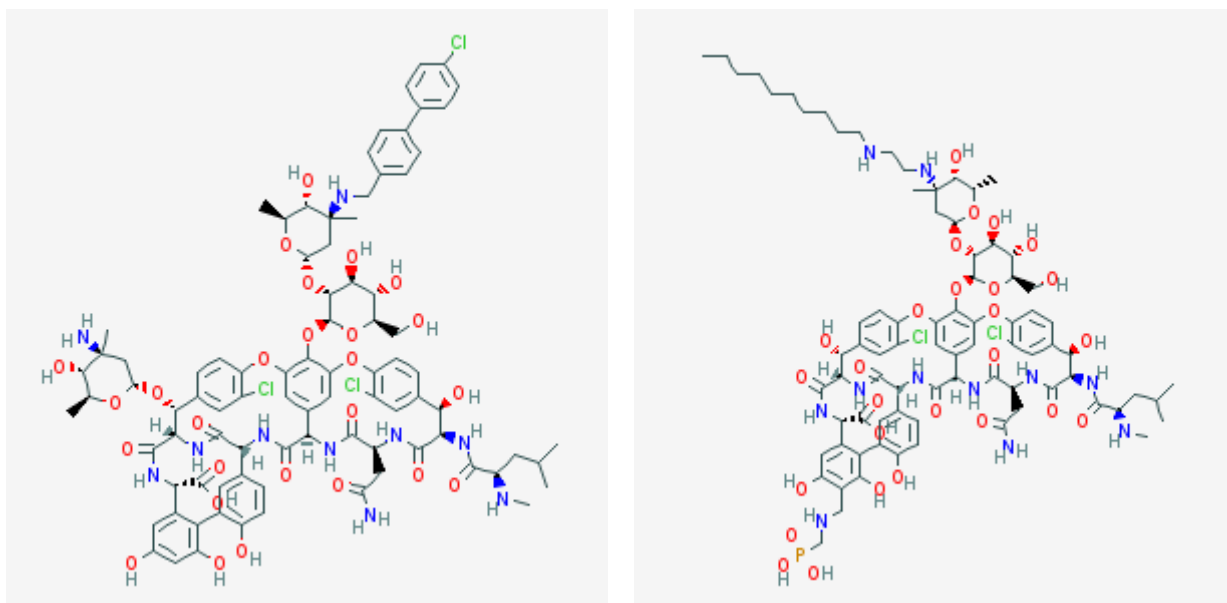
Jedná se o semi-syntetická glykopeptidová antibiotika druhé generace, které vychází ze struktury vankomycinu. Mají stejnou strukturu heptapeptidu jako vankomycin. Vývoj nových antibiotik podnítl zvýšený výskyt rezistencí vůči vankomycinu a teikoplaninu za posledních dvacet let.

3.1.4.1 Oritavancin

Jedná se o p-chlorofenylbenzyl derivát přírodního glykopeptidu chloroeremomycinu (Obr. 6). Chloroeremomycin má v porovnání s vankomycinem navíc monosacharid, 4-epi-vankosamin, na 6. pozici heptapeptidu. Oritavancin byl nasyntetizován koncem 90. let 20. století. Oritavancin vykazuje rychlou a na koncentraci závislou baktericidní aktivitu, bez ohledu na rezistenční fenotyp nebo bakteriální kmen. Tato vlastnost je způsobena uchycením chlorofenylbenzylvého postranního řetězce k membráně (Belley et al., 2010). Navíc má větší schopnost tvořit diméry, které váží oba konce prekurzorů, D-Ala-D-Ala nebo D-Ala-D-Lac. Tudíž, nejen že i inhibuje syntézu buněčné stěny (inhibice transpeptidace a transglykosylace), ale je schopný narušit integritu membrány. Minimální inhibiční koncentrace (MIC) pro oritavancin gram-pozitivní koků (stafylokoky, enterokoky, streptokoky) je velmi nízká. Navíc zůstává aktivní proti kmenům s rezistencí na glykopeptidy první generace. Citlivost k oritavancinu je mírně snížena při expresi genu *vanZ* z *vanA* genového klastru a obecně v enterokokích s fenotypem VanA a VanB. Zvláště pokud dojde k mutaci v regulačním genu *vanB* klastru, který je indukován i pomocí teikoplaninu či je konstitutivně exprimován

dochází k mírné úrovni rezistence k oritavancinu (Arthur et al., 1999; Patti et al., 2009). Oritavancin má dlouhý poločas života a zůstává dlouho detekovatelný v organismu. Kvůli této vlastnosti je značně toxický pro pacienta (Van Bambeke, 2006; Zhanel et al., 2012).

Obrázek 6 Chemická struktura oritavancinu (vlevo) a telavancinu (vpravo)– Zdroj: PubChem, NCBI



3.1.4.2 Telavancin

Semi-syntetický derivát vankomycinu má na rozdíl od vankomycinu připojenou hydrobofnní část na disacharidu (decylaminoethyl) a hydrofilní část, fosfonomethylaminomethylový substituent na heptapeptidovém základu (Obr. 6). Jeho působení zahrnuje především depolarizaci a permeabilizaci bakteriální membrány a stejně jako ostatní glykopeptidová antibiotika inhibuje syntézu buněčné stěny. Má rychlé baktericidní účinky i na rezistentní kmeny v závislosti na zvolené koncentraci. Jeho poločas života je však kratší než u oritavancinu. Dobře penetruje přes tkáň a hromadí se ve velké míře v makrofázích, které potom vykazují baktericidní účinky proti stafylokokům. Je učen pro léčbu nemocničních pneumonií způsobených MRSA nebo kmenem *Streptococcus pneumoniae* s mnoholékovou rezistencí, dobře tak i cSSSI (kompikované kožní a strukturní infekce) spojené s MRSA (Higgins et al., 2005; Van Bambeke, 2006).

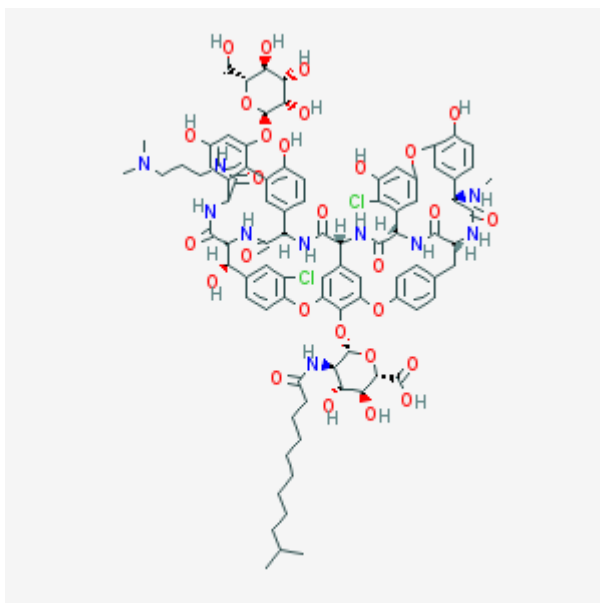
3.1.5 Deriváty teikoplaninu

Jedná se o semi-syntetická glykopeptidová antibiotika druhé generace, které vychází ze struktury teikoplaninu, heptapeptid je složen pouze z aromatických kyselin.

3.1.5.1 Dalbavancin

Dalbavancin je semi-syntetický derivát přírodního analogu teikoplaninu, glykopeptidu A-40926. Dalbavancin se od A-40926 liší přemístěním acylaminoglukuronové kyseliny na čtvrtou pozici heptapeptidu a odstraněním acetylglukozaminu v této pozici (Obr. 7). Nejedná se o nejvíce aktivní antibiotikum ale jeho dobrá snášenlivost léčeným organismem ho řadí do popředí glykopeptidových antibiotik druhé generace. Dalbavancin, na rozdíl od oritavancinu a televancinu, ztrácí aktivitu k enterokokům a stafylokokům nesoucí *vanA* rezistenční genový klast, ale zůstává velmi dobře účinný proti citlivým stafylokokům a streptokokům. Dalbavancin vykazuje dlouhý poločas života (6-10 dní). Je velice účinný v léčbě ABSSSI (akutní bakteriální kožní a strukturní infekce) (Candiani et al., 1999; Chen et al., 2007).

Obrázek 7 Chemická struktura dalbavancinu – Zdroj: PubChem, NCBI



3.2 Rezistence ke glykopeptidovým antibiotikům

V 80. letech 20. století bylo velkým překvapením, že se objevily první klinické izoláty enterokoků rezistentních k vankomycinu (VRE) (Uttley et al., 1989). Klinické izoláty vykazovaly dva různé fenotypy s projevem vysoké úrovně rezistence a nízké úrovně rezistence. Tyto fenotypy se lišily tím, že kmeny s nízkou úrovní rezistence byly citlivé k teikoplaninu, ale odolné k vankomycinu. Kmeny s fenotypem vykazující vysokou úroveň rezistence byly odolné vůči vankomycinu i teikoplaninu (Courvalin, 1990). Později se zjistilo, že za odlišnou úroveň rezistence můžou dva typy genových klastrů *vanA* a *vanB*. *VanA* je zodpovědný za vysokou úroveň rezistence ke glykopeptidům (rezistentní k vankomycinu i teikoplaninu) a *vanB* za nízkou úroveň (rezistentní k vankomycinu, citlivé k teikoplaninu). Oba rezistenční klastry udělují rezistenci stejným mechanismem a jsou kódované příbuznými

enzymy. Rozdíl je ve třech genech *vanHAX* pro *vanA* typ a *vanH_BBX_B* pro *vanB*, které jsou nepostradatelné k získání rezistence vůči glykopeptidům (Arthur et al., 1992; Arthur and Quintiliani, 2001). V současnosti je známo celkem sedm různých fenotypů rezistence ke glykopeptidovým antibiotikům u enterokoků, jedná se o již zmíněný *VanA*, *VanB* fenotyp a dále o *VanC*, *VanD*, *VanE*, *VanG*, *VanL*, *VanM* a *VanN* fenotyp, jež jsou popsány specifickými operony. Počet genů v rezistenčním klastru je variabilní a záleží na kmeni, ve kterém se vyskytuje, ale základ pěti genů *vanRSHAX* je zastoupen v dosud známých rezistenčních klastrech (Perichon and Courvalin, 2009).

Kmeny vykazující *vanA* rezistenční fenotyp byly studovány intenzivněji, a tudíž jako první přinesly první náznaky mechanismu rezistence ke glykopeptidům. *VanA* fenotyp vykazuje inducibilní rezistenci k vysoké hladině vankomycinu, teikoplaninu a moenomycinu (Nicas et al., 1989). Tento typ rezistence redukuje aktivitu všech glykopeptidů v různém rozsahu, ale nevyskytuje se zde spojená rezistence s dalšími inhibitory buněčné stěny. Vankomycin indukuje syntézu dvou proteinů, které jsou detekovatelné v membránové frakci jako 39 kDa protein, který byl identifikován jako VanA ligáza nezbytná k syntéze buněčné stěny v přítomnosti glykopeptidů a D,D-karboxypeptidáza, jenž není nutný k rezistenci. Ačkoliv *vanA* fenotyp je výhradně spjat s *Enterococcus spp.*, rozšíření tohoto typu rezistence na další lidské patogeny není vyloučen (Arthur and Courvalin, 1993).

Proto se začal usilovně zkoumat mechanismus této rezistence, aby došlo k přesnému pochopení biochemických a genetických aspektů vzniku odolných kmenů a později se tak mohlo předejít již při syntéze nových léčiv vzniku nové rezistence.

3.2.1 Základní rezistenční mechanismus

Základní mechanismus vzniku rezistence spočívá ve změně syntézy koncového dipeptidu, jenž nekončí D-alanyl-D-alanin, ale D-Ala- D-laktát (v některých případech D-Ala-D-serin). Tuto změnu katalyzují tři enzymy z rezistenčního genového klastru VanHAX. Modifikací cíle klesá schopnost vazby glykopeptidového antibiotika až 1000 krát (Arthur and Courvalin, 1993).

3.2.1.1 Enzymy VanHAX zodpovědné za modifikaci konce D-Ala-D-Lac

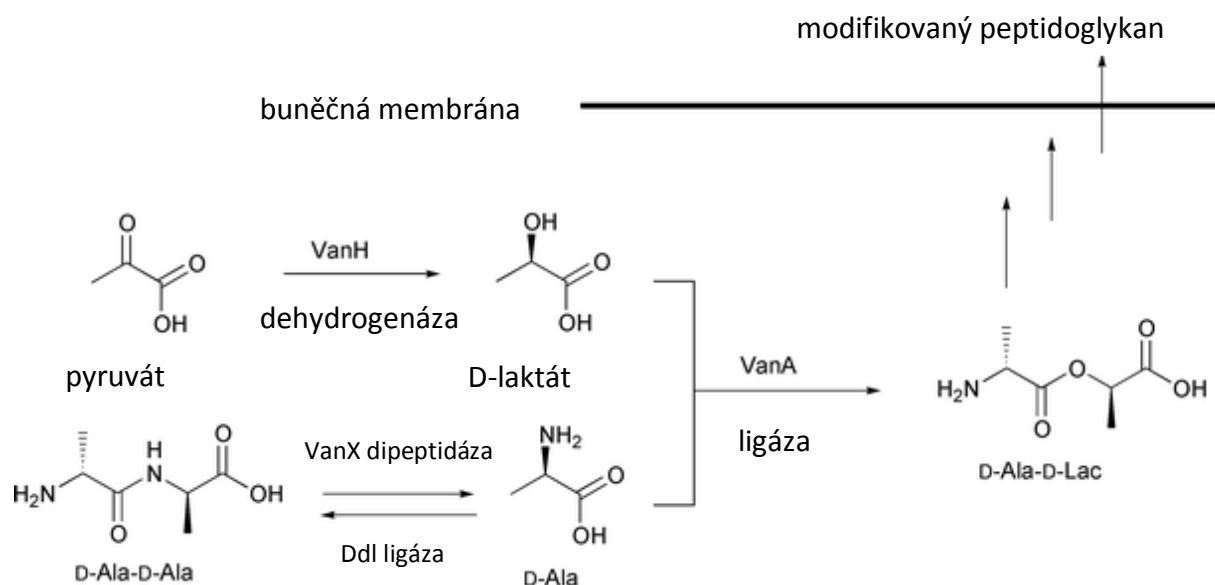
Enzym VanH dehydrogenáza je příbuzná bakteriálním D-laktátdehydrogenázám. Hlavní funkcí VanH dehydrogenázy je redukovat pyruvát na D- laktát (Obr. 8). D- laktát je substrátem pro další enzym VanA ligázu. VanA ligáza tvoří esterovou vazbu mezi D-Ala a D-Lac. Spojení mezi VanH a VanA má za následek vznik rezistence k vankomycinu v důsledku

přemístění amidové skupiny na posledním D-Ala peptidoglykanového prekurzoru (Bugg et al., 1991; Stoll et al., 1998).

VanA ligáza byl první definovaný protein, jenž se podílí na vzniku rezistence k vankomycinu. Jedná se o 38kDa protein spjatý s membránou. VanA ligáza je sekvenčně podobná s D-Ala-D-Ala ligázami (Ddl), které jsou zodpovědné za syntézu D-Ala-D-Ala dipeptidu pro peptidoglykan (Walsh, 1989; Kuzin et al., 2000). Ale u VanA ligázy byla substrátová specifita modifikována a zaměřuje se na syntézu různých kombinací dipeptidů např. D-Ala-D-Met, D-Ala-D-Phe, ale především D-Ala-D-Lac. VanA ligáza spojuje esterovou vazbou D-Lac s D-Ala za vzniku dipeptidu (Bugg et al., 1991). Nově vzniklý dipeptid D-Ala-Lac je zpracováván enzymem MurF, který produkuje muramyl-peptidyl-D-laktát pro syntézu modifikovaného peptidoglykanového prekurzoru

VanX je dipeptidáza obsahující zinek, která hydrolyzuje D-Ala-D-Ala dipeptidový konec peptidoglykanového prekurzoru, který je stále syntetizován pomocí Ddl ligáz. Tímto způsobem zabraňuje častému výskytu cíle pro glykopeptidová antibiotika. VanX homology byly objeveny i u bakterií, které produkují vankomycin a podobné glykopeptidické látky, ale také překvapivě u *Escherichia coli*. Zinek tvoří aktivní místo enzymu (Arthur et al., 1998; Lessard and Walsh, 1999).

Obrázek 8 Syntéza modifikovaného dipeptidového konce D-Ala-D-Lac peptidoglykanového prekurzoru – Převzato od (Gao, 2002)



3.2.1.2 Regulační systém VanRS

Syntéza enzymů z *van* genového klastru je řízena dvou-komponentovým regulačním systémem VanR-VanS, v závislosti na úrovni jeho transkripce. Tento systém je kódován přední částí klastru. VanR a VanS jsou esenciální pro vznik rezistence k vankomycinu v enterokocích, bez nich se nespustí exprese *vanH*, *vanA* a *vanX* a tedy základní mechanismus rezistence ke glykopeptidovým antibiotikům založená na modifikaci dipeptidového konce peptidoglykanového prekursoru (Gagnon et al., 2011).

3.2.1.2.1 VanR

VanR je transkripční aktivátor. VanR je 231 aminokyselin dlouhý protein s molekulovou hmotností 26 612 Da. Srovnávací analýzou aminokyselinových sekvencí s proteinovou databází NBRF byla zjištěna podobnost mezi VanR a regulátory odpovědi (RR) (Arthur et al., 1992). VanR je aktivován fosforylací, kterou zprostředkovává buď VanS při indukčních podmínkách nebo také fosfátovou skupinu přijímá z acetylfosfátu. či heterologní histidin kinázy. Po fosforylaci VanR dochází k aktivaci transkripce *vanHAX* genů díky aktivaci promotorů (Arthur et al., 1999; Depardieu et al., 2007).

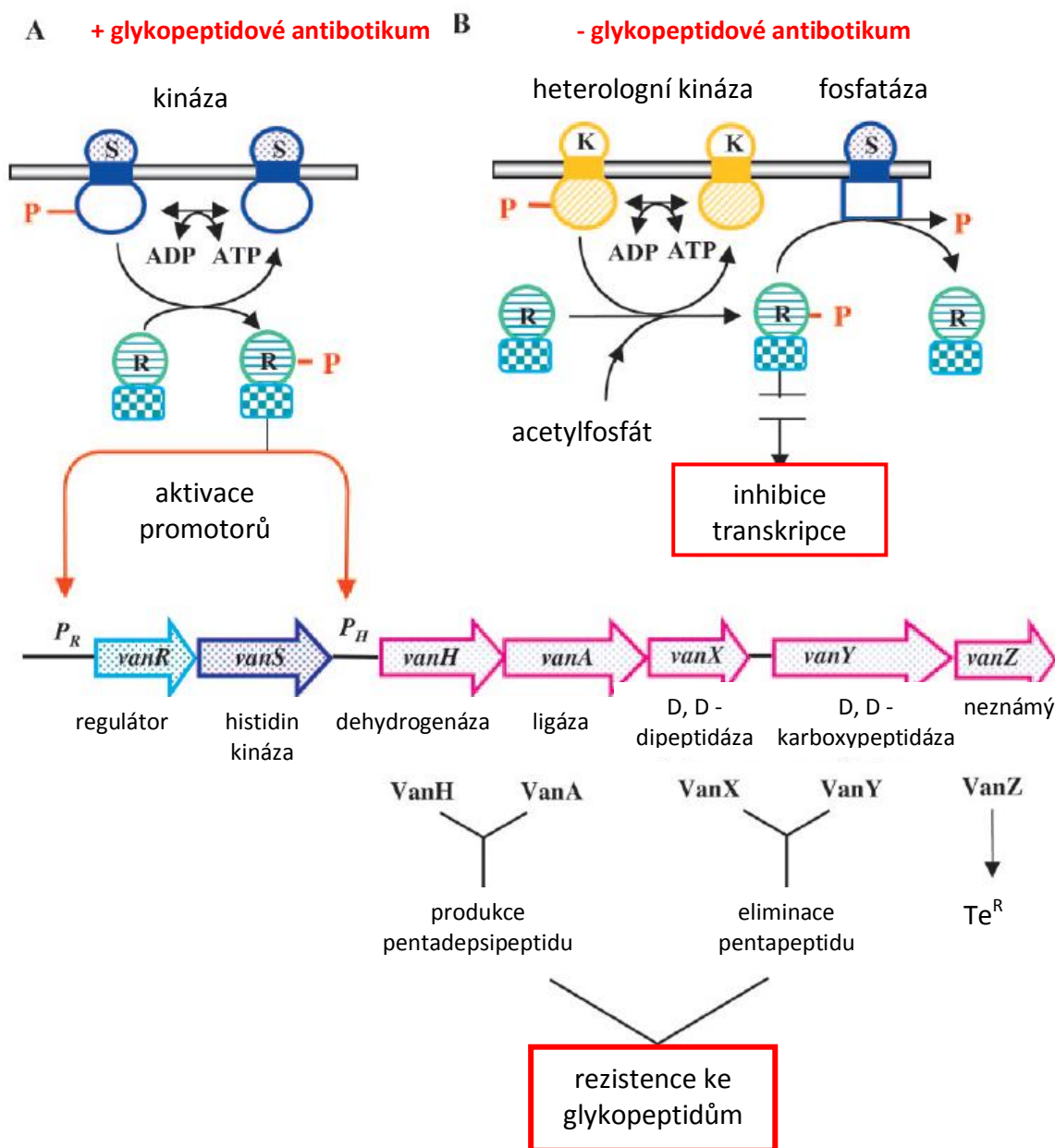
3.2.1.2.2 VanS

VanS je 384 aminokyselin dlouhý protein s molekulovou hmotností 43 847 Da. Srovnávací analýzou aminokyselinových sekvencí s proteinovou databází NBRF byla zjištěna podobnost mezi VanS a histidin protein kinázami (HPK). VanS stimuluje VanR závislou transkripci a je spojen s histidin protein kinázami interagující s membránou, které hlídají úroveň fosforylační regulační odpovědi (Arthur et al., 1992).

VanS má dvě různé funkce v závislosti na indukčních podmínkách (Obr. 9). Jednou z nich je fosfatázová aktivita, která brání fosforylaci VanR heterologní histidin kinázou nebo acetylfosfátem při neindukčních podmínkách (např. v nepřítomnosti glykopeptidových antibiotik). Fosfatázová aktivita VanS je v přítomnosti glykopeptidových antibiotik inhibována a naopak je aktivována kinázová aktivita.

Kinázová aktivita VanS katalyzuje autofosforylaci specifického konzervovaného histidinového zbytku na pozicích 164 nebo 233 (pro VanS a VanS_B), následně dochází k přenosu fosfátové skupiny na VanR konkrétně je fosforylován aspartát v pozici 53 (Arthur et al., 1999; Depardieu et al., 2007).

Obrázek 9 Schéma dvou-komponentového regulačního systému při indukčních a neindukčních podmínkách (Depardieu et al., 2007).



3.2.1.2.3 Promotory P_H , P_R

V rezistenčních genových klastrech jsou vždy dva promotory, jejichž aktivace závisí na dvoukomponentovém systému VanRS. U *vanA* rezistenčního genového klastru jsou promotory, P_H a P_R umístěné před geny *vanR* a *vanH*, inaktivní v nepřítomnosti *vanR* a *vanS*. Indukovatelné v přítomnosti glykopeptidů a obou genů *vanRS* a konstitutivně aktivováni VanR v nepřítomnosti VanS. Což znamená, že indukce *vanHAX* operonu zahrnuje amplifikaci smyčky vyplývající z vazby fosfo-VanR k P_R promotoru a vzrůstající transkripci *vanS* a *vanR*.

genů. Plná aktivace promotorů P_H a P_R je v nepřítomnosti VanS, tudíž senzor negativně řídí regulaci VanR v nepřítomnosti glykopeptidů (Arthur et al., 1997).

3.2.1.3 Rezistenční fenotypy enterokoků

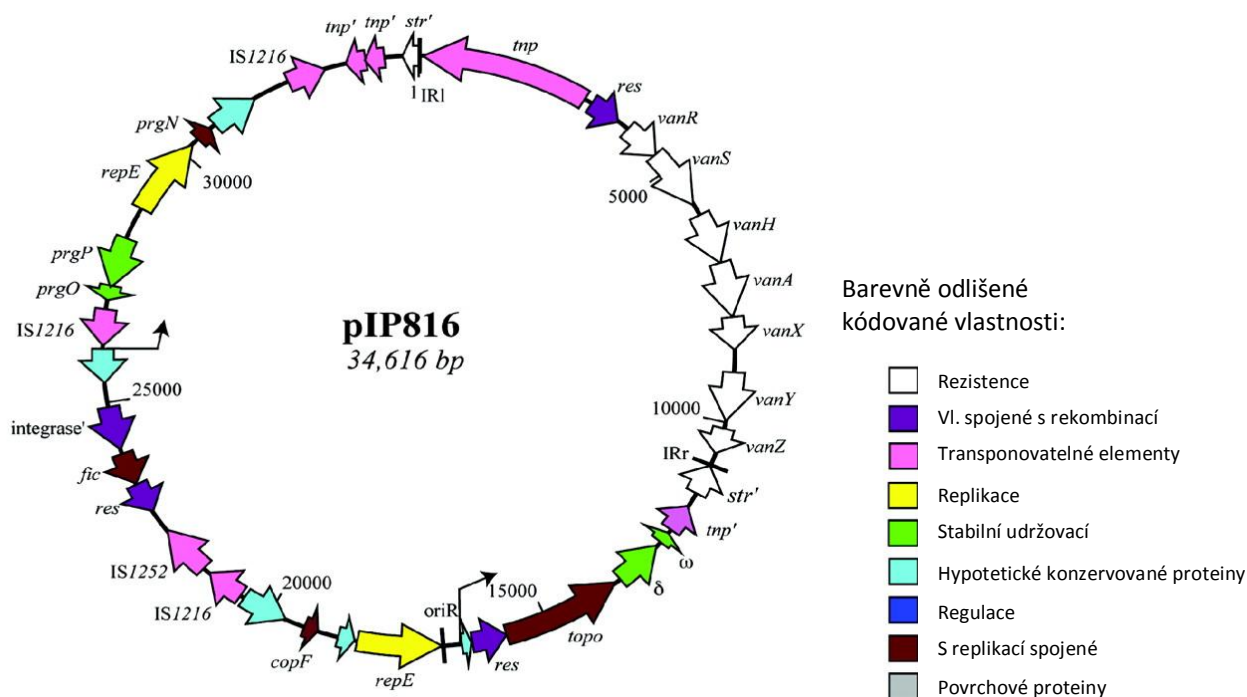
3.2.1.3.1 Van A fenotyp

Sekvenční analýzou oblasti udílející rezistenci ke glykopeptidům byl poprvé určen *vanA* genový klastř, jenž je nesený plazmidem pIP816 v *Enterococcus faecium* BM4147 (Obr. 10). Tento plazmid má znatelnou podobnost s transpozóny rodiny Tn3. U enterokoků je vyšší rezistence ke glykopeptidům právě spjatá s přítomností transponovatelných elementů, v tomto případě Tn1546. Za široké rozšíření rezistence mezi různé druhy enterokoků tedy není zodpovědná pouze konjugace plazmidů, ale i transpozice elementů (Handwerger et al., 1990). Transpozón kóduje devět polypeptidů, které můžeme rozdělit do čtyř funkčních skupin: transpoziční funkce (otevřené čtecí rámce ORF1 a ORF2), regulace genů rezistenčních k vankomycinu (VanR a VanS), produkce depsipeptidů kvůli rezistenci ke glykopeptidům (VanH, VanA a VanX), a další doplňkové proteiny, které jsou zahrnuty v peptidoglykanové syntéze, ale nejsou potřebné pro glykopeptidovou rezistenci (VanY a VanZ). Transpozáza (ORF1) a resolváza (ORF2) Tn1546 jsou příbuzní členové transpozáz z rodiny *Enterobacteriaceae*. Původ Tn1546 a jeho nukleotidové sekvence nebyla nalezena v citlivých kmenech *E. faecalis* nebo *E. faecium*, což naznačuje, že tyto rezistenční geny nejsou součástí chromosomální DNA těchto druhů (Arthur et al., 1993). Obsah G+C párů se liší u genů nutných ke vzniku rezistence od přídatných genů v genovém klastru. Geny nezbytné pro vznik rezistence (*vanR*, *vanS*, *vanA*, *vanH*, *vanX*) jsou G+C bohaté sekvence (41-45%), v porovnání obsahu u *vanY* (31%) a *vanZ* (29%). Což naznačuje, že geny mají odlišný původ (Arthur et al., 1993).

Srovnávací DNA analýzou bylo zjištěno, že Tn1546 se rozšiřuje mezi klony *Enterococcus faecium* jako součást větších genetických jednotek (ale nejspíš menších než plazmid), případně jako složka transpozónu lemovaného IS1216 elementy. pIP816 pocházející z prvního objeveného kmene *Enterococcus faecium* rezistentního ke glykopeptidům, byl osekvenován. Jeho délka je 34 616 bp, obsahuje 36 kódujících sekvencí (z nich 31 má známou či predikovanou funkci), průměr G+C obsahuje je 36,9%. Ovšem pIP816 není jediný plazmid, ve kterém se objevuje *vanA* rezistenční klastř. Taktéž v plazmidu pVEF4, který byl poprvé vyizolován z kmene *E. faecium* (399/F98/A4) nacházející se v norském chovu zvířat, kde byl používán avoparcin jako růstový stimulant zvířat. Částečná

délka sekvence pVEF4 je 44 443 bp, obsah G+C párů je 36,2% a má 46 kódujících sekvencí (z nich 39 má známou či predikovanou funkci). Oba plazmidy také kódují pseudo-streptomycin rezistenční gen (*str*). Sekvenční analýza také odhalila přítomnost Tn1546 u obou typů plazmidů, což je jen dalším důkazem schopnosti rezistenčních klastrů šířit se pomocí horizontálního přenosu (Sletvold et al., 2010).

Obrázek 10 Schématická mapa plazmidu pIP816, který nese *vanA* rezistenční klastr-(Sletvold et al., 2010)



3.2.1.3.2 VanB fenotyp

Enterokokové s VanB fenotypem jsou rezistentní k vankomycinu, ale na teikoplanin jsou citlivé. Může za to rozdílná senzorová kináza VanS_B, která vnímá signály odlišně než VanS a je aktivována pouze vankomycinem. S VanA fenotypem má 60% identitu proteinů VanHAX, ale u dvou-komponentového regulačního systému už pouze 34% (VanR) a 23% (VanS). Přes tuto odlišnost katalyzují stále podobné reakce. Geny *vanB* rezistenčního klastru mohou být přítomné nejen na plazmidu, ale také na chromosomální DNA *Enterococcus faecalis* a *E. faecium* (Baptista et al., 1996; Depardieu et al., 2007).

Při selekci mutant rezistentních k teikoplaninu byly objeveny tři různé fenotypové třídy: konstitutivní-, indukovatelná- a heterogenní exprese rezistenčních genů dle typů změn funkce VanS_B.

1. indukovatelná

Substituce v senzorové doméně VanS_B vede k indukovatelné expresi rezistence k vankomycinu či teikoplaninu.

2. konstitutivní

Substituce na dvou různých místech, před a za histidinem 233, což je předpokládané autofosforylační místo. Tato substituce pravděpodobně vede k poškození fosforylace VanR_B.

3. heterogenní

Tento fenotyp mutant tkví pravděpodobně v nulových alelách *vanS_B*, jelikož mutace zavádějí rozličné stop kodóny v různých pozicích genů. (Arthur and Quintiliani, 2001; Baptista et al., 1996; Baptista et al., 1997; Depardieu et al., 2007; Lefort et al., 2004)

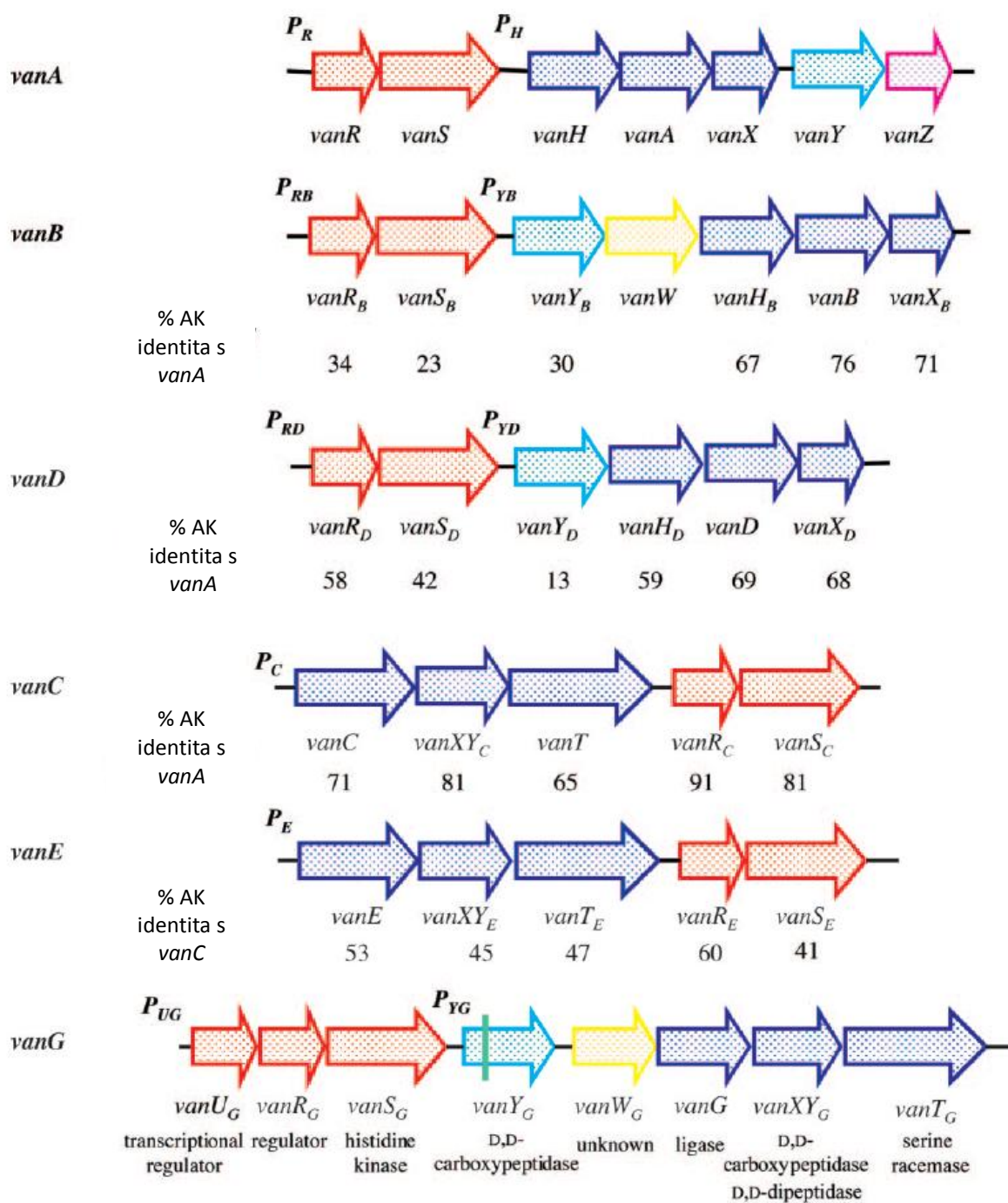
3.2.1.3.3 Další fenotypy

Rezistenční mechanismus ke glykopeptidovým antibiotikům u enterokoků může vycházet i z další substituce na konci peptidoglykanového prekurzoru, místo D-Ala-D-Ala byl analýzou zjištěn konec D-Ala-D-Ser. Tato substituce vede k šestinásobnému snížení citlivosti ke glykopeptidům (Billotklein et al., 1994).

Enterococcus gallinarum, *E. casseliflavus* a *E. flavescens* mají na chromosomu *vanC* rezistenční klast, a jsou odolné k nízké hladině vankomycinu, právě díky konstitutivní produkci peptidoglykanového prekurzoru s koncem D-Ala-D-Ser, ale zůstávají citliví k teikoplaninu. Pro syntézu tohoto konce jsou potřeba tři enzymy: racemáza (VanT), ligáza (VanC) a s dvojitou funkcí D,D-dipeptidáza / D,D-dikarboxypeptidáza (VanXYC). Celý klast zahrnuje i dvou-komponentový regulační systém VanR_C a VanS_C (Leclercq et al., 1992; Reynolds and Courvalin, 2005).

Další fenotypy vyskytující se u enterokoků jsou založeny na rozdílnosti klíčových ligáz. Peptidoglykanový konec prekurzoru D-Ala-D-Lac se tedy vyskytuje nejen u *VanA* a *VanB*, ale i u *VanD* a *VanM* fenotypů. U enterokoků s fenotypy *VanC*, *VanE*, *VanG*, *VanL* a *VanN* je syntetizován konec prekurzoru v podobě D-Ala-D-Ser. Inducibilní exprese operonu je u klastů *vanA*, *vanB*, *vanG*, *vanE*, *vanL*, *vanM* a konstitutivní exprese operonu je u *vanC*, *vanD*, *vanN*. Porovnáním aminokyselinové podobnosti jednotlivých proteinů kódovaných van klasty lze vidět značnou podobnost a konzervovanost některých proteinů (Obr. 11). Až na klasty *vanA*, *vanB* a *vanM*, které se můžou objevovat jak na plazmidu, tak i na chromosomu, se ostatní klasty nacházejí na chromosomu příslušného druhu (Binda et al., 2014; Depardieu et al., 2004).

Obrázek 11 Srovnání *van* rezistenčních genových klastrů (šesti z devíti) - (Depardieu et al., 2007)



3.2.2 Další typy rezistenčních mechanismů

V literatuře jsou popsány další rezistenční mechanismy u gram-pozitivních bakterií, jež nejsou vázané na základní rezistenční mechanismus spjatý s modifikací dipeptidu D-Ala-D-Ala peptidoglykanového prekursoru. Rezistenční mechanismy ke glykopeptidovým antibiotikům mohou být spojené s doplňkovými proteiny rezistenčních klastrů. Ale také

rezistenční mechanismy projevující se u *S. aureus* sníženou citlivostí ke glykopeptidům změnami vyvolanými mutacemi v genomu.

3.2.2.1 Rezistenční charakter doplňkových proteinů rezistenčních klastrů

3.2.2.1.1 VanY dipeptidáza

Jedním z doplňkových proteinů, který není nezbytný pro základní rezistenční mechanismus modifikaci dipeptidového konce peptidoglykanového prekurzoru je VanY. VanY je D,D-karboxypeptidáza se zinkovým aktivním místem, která se nejspíš podílí na ochraně před hromaděním pentapeptidu v cytoplazmě u glykopeptid-rezistentních enterokoků vystavených působení vankomycinu. Jeho přítomnost v genovém klastru zvyšuje úroveň rezistence k teikoplaninu i vankomycinu (Arthur et al., 1994; Arthur et al., 1998).

3.2.2.1.2 VanJ

VanJ je kódován genem, jenž byl nalezen v genovém rezistenčním inducibilním klastru sedmi genů *vanSRJKHAX*. Tento klaster byl objeven u nepatogenní *Streptomyces coelicolor*, hledáním homologů k enterokokovým proteinům VanA, VanH a VanX. *S. coelicolor* je nepatogenní bakterie, která není producentem glykopeptidových antibiotik, ale přesto je rezistentní k vankomycinu. Klaster je indukován pomocí glykopeptidových antibiotik kromě teikoplaninu. *S. coelicolor* je citlivá k teikoplaninu, pokud nedochází k expresi *van* klastru. Při expresi *van* klastru dochází k získání rezistence k teikoplaninu. VanA, VanH a VanX mají vysokou sekvenční identitu (nad 60%) s proteiny v patogenních enterokokích. Je tedy pravděpodobné, že *S. coelicolor* bude mít vlivem exprese těchto genů pozměněnou syntézu peptidoglykanových prekurzorů, které budou obsahovat na peptidylovém konci D-Ala-D-Lac. VanR a VanS tvoří dvou-komponentový regulační systém, jejich identita s VanR a VanS v patogenních enterokokích se pohybuje nad 20%. Geny *vanJ* a *vanK* jsou velice zajímavé, jelikož k nim nebyl nalezen žádný homolog v patogenních enterokokích (Hong et al., 2004). VanK je nezbytný pro základní mechanismus rezistence u *Streptomyces coelicolor*, pomocí jeho enzymatické aktivity je možné dokončit syntézu peptidoglykanu s modifikovaným koncem peptidoglykanového prekurzoru (Hong et al., 2005).

VanJ udílí specificky rezistenci k teikoplaninu a k derivátům teikoplaninu bez účasti dalších proteinů z rezistenčního genového klastru. Bez *vanJ* exprese v genovém klastru jsou kmeny *S. coelicolor* rezistentní pouze k vankomycinu a jemu podobným derivátům (Novotná et al., 2012). VanJ je 330 AA dlouhý protein, předpokládá se, že má tři transmembránové domény na N-konci a jeho funkce v udílení rezistence není známa. (Hong et al., 2004). VanJ

má C konec, tedy aktivní stranu vystrčenou do extracelulárního prostoru. C konec obsahuje konzervovanou doménu, jež nese podobu endonukleázy/exonukleázy/fosfatázy. Z bioinformatické analýzy lze předpokládat, že VanJ by mohl mít stejně jako jeho homolog (StaP) fosfatázovou aktivitu (Novotná et al., 2012).

3.2.2.1.3 VanZ

Sekvenční analýzou Tn1546 mezi *vanY* translačním stop kodónem a pravou invertovanou repeticí transposonu byla odhalena přítomnost jednoho velkého čtecího rámce. Start kodón začíná na pozici 292 nukleotidy TTG a předchází ho RBS (ribosome binding site), což je typické pro gram pozitivní bakterie. Takto přepisovaný protein neznámé funkce, navrhnutý jako VanZ, má 161 aminokyselin a jeho odhadovaná molekulová hmotnost je 18 397 Da. Obsah GC párů je nižší než je obvyklé u enterokoků, což může ukazovat na odlišný původ rezistenčních genů klastru. Exprimovaný protein VanZ zprostředkovává rezistenci k teikoplaninu, ale ne k vankomycinu v *E. faecalis* JH2-2. VanZ je nezbytný pro rezistenci k teikoplaninu při nízké produkci VanH, VanA a VanX. Avšak při vysoké produkci (např. když je klastr přítomen na mutlikopiovém plasmidu) není protein VanZ pro vysokou úroveň rezistence k teikoplaninu potřeba. Rezistence k teikoplaninu udílená VanZ není spjata s konečným začleněním posledního D- alaninu do cytoplasmatického peptidoglykanového prekursoru. Je tedy možné, že Tn1546 udílí rezistenci ke glykopeptidům dvěma různými mechanismy (Arthur et al., 1995).

3.2.2.2 Snížená citlivost *S. aureus* ke glykopeptidům způsobené mutacemi v genomu

Důsledkem většího používání vankomycinu či teikoplaninu na léčbu infekcí způsobených methicilin - rezistentními kmeny *Staphylococcus aureus* (MRSA) se u *S. aureus* objevily dva různé mechanismy rezistence ke glykopeptidovým antibiotikům. Jedním z nich je získání *vanA* rezistenčního genového klastru z enterokoků nesený transpozónem Tn1546, který byl prokázán *in vivo* (Arthur et al., 1993). V roce 2002 byly hlášeny první klinické izoláty, které nesou *vanA* rezistenční klastr a jsou tak odolné proti glykopeptidickým antibiotikům, tzv. GRSA kmeny (Chang et al., 2003; Perichon and Courvalin, 2009). Výskyt GRSA je spíše ojedinělý, mnohem častěji se vyskytuje druhý mechanismus rezistence, který je spjatý s mutacemi v genomu *S. aureus*. Mutace se projevují morfologickými změnami buněčné stěny např. zesílení buněčné stěny nebo aktivací regulačních stresových odpovědí. Mutacemi vyvolaný rezistenční mechanismus se projevuje mírnou úrovní rezistence ke glykopeptidovým antibiotikům (GISA) (Cui et al., 2006; Howden et al., 2010).

První GISA byl vyizolován v roce 1995 a neobsahoval žádný *van* rezistenční klast. Pro koaguláza negativní stafylokoky byly hlášeny nejprve kmeny mírně rezistentní na teikoplanin (TISA) a až později na vankomycin (VISA). Což poukazuje, že vznik rezistence k vankomycinu je pravděpodobně podmíněn vznikem rezistence k teikoplaninu. Za dvacet let došlo významnému nárůstu minimální inhibiční koncentrace pro glykopeptidy (MIC 4-8 µg/ml) u stafylokoků. Zvláště pro teikoplanin u kmenů rezistentních ke gentamicinu a methicilinu (Robert et al., 2006).

Neexistuje univerzální marker všech kmenů GISA (VISA či TISA), jelikož neexistuje jednotný genetický základ vzniku rezistence ke glykopeptidovým antibiotikům. Například nejčastěji pozorovatelná morfologická změna u GISA je zesílení buněčné stěny (Cui et al., 2006). Ale všechny kmeny se sníženou citlivostí ke glykopeptidům (GISA) se neprojevují silnější buněčnou stěnou. Změna citlivosti ke glykopeptidovým antibiotikům je způsobena i dalšími fyziologickými změnami např. projev redukované autolytické aktivity nebo metabolické změny. Ovšem ani přes intenzivní zkoumání není jasný způsob vzniku těchto fyziologických změn (Sieradzki et al., 2003; Nelson et al., 2007; Renzoni et al., 2011).

Právě nejčastěji se projevující jev u GISA kmenů v podobě změn buněčné stěny byl zkoumán podrobněji. A bylo zjištěno, že GISA kmeny se projevují celou škálou fenotypových projevů související se syntézou buněčné stěny např.: produkce netypických muropeptidů a zvýšená exprese proteinů účastnících se syntézy buněčné stěny (PBP) konkrétně PBP2 (PBP2 proteiny mají životně nezbytné aktivity transglykosylázovou a transpeptidační). U některých kmenů se změny projevují naopak redukovanou úrovní exprese PBP2 a PBP4 nebo zvýšeným počtem dipeptidového zbytku D-Ala-D-Ala a mnoho dalších (Howden et al., 2010). Právě zesílení buněčné stěny je nejrozšířenějším jevem GISA kmenů ačkoliv mechanismus vzniku není znám. Zesílení buněčné stěny má za následek vznik nového mechanismu rezistence, který byl pozorován u VISA kmenů. Glykopeptidové antibiotikum (vankomycin) se přes zesílenou buněčnou stěnu dostává pomaleji k cíli svého působení, obtížnější difúze vankomycinu přes buněčnou stěnu. Tento proces vede k ochraně nové syntézy peptidoglykanu v cytoplazmatickém prostoru a tím se buňkám snižuje citlivost k vankomycinu (Cui et al., 2006; Pereira et al., 2007).

Bakterie jsou obecně velmi dobře vybaveny pro přizpůsobení se stresovým podmínkám jako např. působení antibiotik, které vyvolávají celý systém změn v expresi genů jenž se označuje jako stresová odpověď. Získání rezistence ke glykopeptidovým antibiotikům je velice komplexní proces, který zahrnuje řadu regulačních drah, které jsou součástí stresové odpovědi.

Sekvenčními analýzami byly hledány nejčastěji se projevující mutace u kmenů GISA. Nebylo překvapením, že nejčastěji se mutace vyskytovaly v dvou-komponentových regulačních systémech *VraSR*, *WalRK*, *GraRS*. Bylo zjištěno, že se vzrůstající MIC pro vankomycin byl v těchto systémech zaznamenán větší počet jedno-nukleotidových polymorfismů (Hafer et al., 2012). *WalR/WalK* je velice konzervovaný dvou-komponentový systém, který je nezbytný pro přežití buňky, ačkoliv stále nebyl zcela charakterizován. Podílí se pozitivně na autolytické aktivitě dvou hlavních autolysinů u *S. aureus* a účastní se celé řady procesů, které mohou modifikovat podobu buněčné stěny (Dubrac et al., 2007). *GraRS* je pojmenován podle asociace s glykopeptidovou rezistencí, jeho lokus byl také dříve nazýván APS podle jeho funkce obecně vnímat kapacitu antimikrobiálních peptidů. Řídí a kontroluje mnoho genů zahrnutých v syntéze buněčné stěny a je zahrnut ve stresové odpovědi (Poole, 2012).

VraS/VraR je dvou-komponentový systém, který vnímá a reaguje na signály spouštěné aktivními čidly buněčné stěny. Spouští celou sadu genů, které jsou indukovány při vystavení buňky antibiotikům, které způsobují hydrolýzu buněčné stěny nebo inhibici syntézy buněčné stěny, ale nevnímají další stresové faktory z vnějšího prostředí, jako jsou např. osmotické a pH změny či rozličná teplota. Intramembránový senzor *VraS* přijímá signály a aktivuje *VraR* fosforylací. Pokud dojde k vymizení prvotního signálu, *VraR* je deaktivován *VraS* specifickou defosforylací (Kuroda et al., 2003). *Stafylococcus aureus* umí v odpověď na inhibici syntézy buněčné stěny nebo poškození vývoje buňky několika strukturně a funkčně odlišnými antibiotiky aktivovat ochranný stresový systém buněčné stěny (CWSS). Tato odpověď je řízena právě dvou-komponentovým systémem *VraSR*. Pro každé antibiotikum byla zjištěna odlišná indukce CWSS. Což může poukazovat na skutečnost, že indukce CWSS je více esenciální pro ochranu *S. aureus* před účinky konkrétních antibiotik (Dengler et al., 2011). Všechny tyto systémy jsou velice rozsáhlé a projevy jejich mutací mohou mít různou povahu. Bude tedy obtížné nalézt ideální molekulární značku/značky, které by pomohly diagnostikovat přesně kmeny VISA (či obecně kmeny GISA). Pokud by se takový značka našla, stala by se důležitým diagnostickým nástrojem pro optimální nastavení léčby pacientů.

4 Materiál a metody

4.1 Materiál

4.1.1 Bakteriální kmeny

E. coli JM109 (Promega)

Tento kmen byl použit pro transformaci a pomnožení vektoru pRMC2 a konstruktů pRMC2 nesoucí geny *vanZ_{Tei}*, *vanZ_{Tei} his tag*, *vanZ_g*, *vanZ_g his tag*.

Genotyp: endA1, recA1, gyrA96, thi, hsdR17 (rk⁻, mk⁺), relA1, supE44, Δ(lac-proAB), [F' traD36, proAB, laqIqZΔM15].

Staphylococcus aureus RN4220 (Focus Bio-Inova)

Kmen *Staphylococcus aureus* RN4220 byl použit pro expresi proteinů VanZ_{Tei}, VanZ_{Tei} his tag, VanZ_g, VanZ_g his tag a pro sledování rezistenčního fenotypu udíleného těmito proteiny.

Enterococcus faecium E1162 (získáno od Willems RJ; University Medical Center Utrecht, Utrecht, The Netherlands)

Citlivý kmen byl použit jako recipient pro elektroporaci vektorů pRMC2, pAT396, pAT398 a konstruktů pRMC2 s geny *vanZ_{Tei}*, *vanZ_{Tei} his tag*, *vanZ_g*, *vanZ_g his tag* a UP2TEXDOWN2, UPSALTTEXDOWN2.

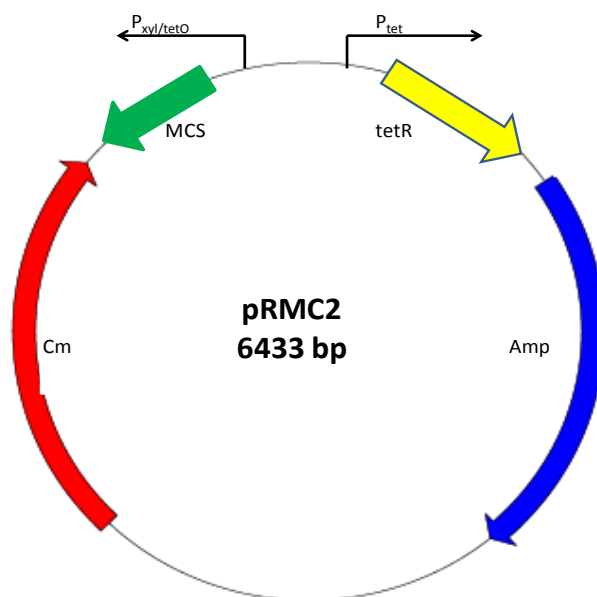
Genotyp: klinický izolát z krve; CC17; Amp^r Van^s Chl^s Gen^s Ery^s Esp⁺ (Heikens et al., 2007)

4.1.2 Vektory

pRMC2 6433 bp (získáno od T. Foster)

Vektor byl primárně zkonstruován pro kontrolovatelnou expresi genů ve *Staphylococcus aureus*. Jedná se o modifikovaný klonovací vektor pALC2703, který má mutovaný indukibilní P_{xyl/tetO} promotor a obsahuje mnohonásobná klonovací místa viz obr. 12. P_{xyl/tetO} promotor je aktivován přítomností tetracyklinu. V této diplomové práci byl pro indukci použit netoxický homolog tetracyklinu, anhydrotetracyklin. Jako selekční marker byl použit chloramfenikol (Corrigan and Foster, 2009).

Obrázek 12 Expresní vektor pRMC2: MCS – mnohonásobná klonovací místa, tetR – tetracyklinový represor, Amp – gen kódující rezistenci k ampicilinu, Cm- gen kódující rezistenci k chloramfenikolu



4.1.3 Kultivační média

Všechna uvedená média byla sterilizována autoklávováním při 121°C, 15 minut. Výjimkou je médium na uchovávání kompetentních buněk, které bylo sterilizováno filtrací.

LB médium

Složení:

Trypton	10 g
Kvasničný extrakt	5 g
NaCl	5 g
Destilovaná H ₂ O doplnit na objem	1000 ml
pH = 7,5	

LB agar

Složení:

LB médium	1000 ml
Agar	15 g
pH = 7,5	

BHI médium

Složení:

Brain - heart infusion	9,25 g
Destilovaná H ₂ O doplnit na objem	250 ml

pH = 7,5

BHI agar

Složení:

Brain - heart infusion 9,25 g

Agar 3,75g

Destilovaná H₂O doplnit na objem 250 ml

pH = 7,5

B₂ médium

Složení:

Kasein hydrolyzát 10 g

Kvasničný extrakt 25 g

NaCl 25 g

K₂HPO₄ 1 g

Glukóza 5 g

Destilovaná H₂O doplnit na objem 1000 ml

pH = 7,5

MH médium (médium pro měření citlivosti)

Složení:

Mueller Hinton Broth 23 g

Destilovaná H₂O doplnit na objem 1000 ml

Médium pro uchovávání kompetentních buněk

Složení:

Polyethylenglykol (Mw = 8000) 3,6 g

Glycerol 10,8 ml

1 M MgSO₄ 0,36 ml

LB médium doplnit do objemu 30 ml

4.1.4 Oligonukleotidy

Oligonukleotidy (tabulka č. 1) používané v experimentální části byly syntetizovány firmou Sigma. Oligonukleotidy byly ředěny v destilované vodě na pracovní koncentraci 100 μM. Při navrhování oligonukleotidů pro amplifikaci *vanZ* genů byla před start kodónem přidána sekvence pro restrikční endonukleázu (SacI) a za stop kodón pro restrikční endonukleázu (EcoRI). Shine Dalgarno sekvence byla převzata z přirozené sekvence

předcházející gen *vanZ*. U *vanZ_{Tei}* byl změněn start kodón, u původní sekvence genu se vyskytuje kodón pro leucin (TTG). Pro účely klonování byl použit klasický start kodón pro methionin (ATG).

Tabulka 1 Seznam oligonukleotidů použitých v experimentální části diplomové práce. Podtržené sekvence jsou restrikční místa pro *SacI* u forward primeru, *EcoRI* u reverse primeru.

Název oligonukleotidu	Oligonukleotid (5'-3')
TecVanZ_ <i>SacI</i> _F	TTT <u>TGAGCTCT</u> AGAGGAAATTATAATGGGAAAAATATTATCTAGAGGATTGCTAGCTTTATATTTAGTG
TecVanZ R	AAA <u>AGAATTCT</u> TACACGTAATTTATTCTTAAATGGGTACGGTAAACG
TecVanZhis R	AAA <u>AGAATTCT</u> TAAATGATGATGATGATGATGTGAACCACCACCTGGCACGTAATTTATTCTTAAATGGGTACGGTAAACGAG
gVanZ_ <i>SacI</i> _F	TTT <u>TGAGCTCGG</u> TTTTTCGATGGTATACTTTTAAATGGAGGAGATGTCTATGCGGTA TGTATC
gVanZ R	AAA <u>AGAATTCT</u> TATTGAAGACGGACAGTTCGGGTCAAAAATAAAAAAG
gVanZhis R	AAA <u>AGAATTCT</u> TAAATGATGATGATGATGATGTGAACCACCACCTGGTTGAAGACGGACAGTTCGGGTCAAAAATAAAAAAG
pRMC2 F	ACATTATATCATTGATAGAGTTATTTGTCAAACCTAG
pRMC2 R	ATGTGCTGCAAGGCGATTAAGTTG

4.1.5 Enzymy

Restrikční endonukleázy (New England BioLabs)

SacI-HF: CutSmartTM pufr, reakční teplota 37 °C

EcoRI-HF: CutSmartTM pufr, reakční teplota 37 °C

DNA polymeráza (New England Biolabs)

Phusion® High-Fidelity DNA polymeráza 2 U/ µl

Ligáza (Fermentas)

T4 DNA ligáza 1U/ µl

4.1.6 Roztoky a pufry

Fyziologický roztok

Složení:

NaCl 0,85 g

Destilovaná H₂O 100 ml

Příprava: Odvážené množství chloridu sodného se rozpustí v destilované vodě a následně se 0,9% roztok NaCl sterilizuje autoklárováním ve 121 °C, 15 minut.

10% glycerolový roztok

Složení:

Glycerol 10 ml

Destilovaná H₂O 90 ml

Příprava: 10% roztok glycerolu se sterilizuje filtrací.

5% SDS

Složení:

SDS 5 g

Destilovaná H₂O doplnit na objem 100 ml

Příprava: Po rozpuštění SDS v destilované H₂O se roztok sterilizuje filtrací.

50 x TEA pufr

Složení:

TRIS 242 g

Kyselina octová 57,1 ml

500 mM EDTA 100 ml

Destilovaná H₂O doplnit na objem 1000 ml

pH = 8

TE¹⁻

10 mM Tris-HCl; 0,1 mM EDTA; pH = 8,0

TES pufr

1 M Tris-HCl; 0,5 M EDTA; 25g sacharózy (V=100ml); pH = 8

10 x DNA vzorkový pufr

50 mM EDTA; 1% SDS; 40 % sacharóza; 0,25 % bromfenolová modrá; 10 mM Tris-HCl; pH = 8,0

Ligační pufr

10 x pufr pro T4 DNA ligázu (Fermentans)

Restrikční pufr

CutSmart™ (New England BioLabs)

Pufr pro polymerázu

5 x HF Phusion pufr (New England BioLabs)

4.1.7 Použité chemikálie

Chemikálie	Výrobce	Zkratka nebo vzorec
Aceton	Lach:Ner	CH ₃ COCH ₃

Agar	Oxoid	
Agaróza	SeaKEM	
Anhydrotetracyklin hydrochlorid	Fluka	AnhyTet
Brain heart infusion	Oxoid	BHI
BODIPY® FL Vankomycin	Life technologies	FL- Van
Bromfenolová modrá	Bio-Rad	C ₁₉ H ₁₀ Br ₄ O ₅ S
Dalbavancin	Od Matthew A. Coopera	Dalb
Deoxynukleotid trifosfáty	Promega	dNTPs mix
Dodecylsulfát sodný	Sigma	SDS
Erythromycin	Duchefa Biochemie	ERY
Ethanol	Fagron	EtOH
Ethidium bromid	Sigma	EtBr
Ethylendiamintetraacetát	Sigma	EDTA
Fluorescenčně značený teikoplanin	MBÚ AV ČR	FL-Tei
Gentamicin	Duchefa Biochemie	GEN
Glukóza	Lach:Ner	
Glycerol	Lach:Ner	
Glycin	PENTA	
Green safe premium	nzytech	
Hydrogenfosforečnan draselný	AppliChem	K ₂ HPO ₄
Hydroxid sodný	Lach:Ner	NaOH
Chloramfenikol	Duchefa Biochemie	CM
Chlorid draselný	Lachema	KCl
Chlorid sodný	Lach:Ner	NaCl
Isopropanol	Lach:Ner	
Karbenicilín	Duchefa Biochemie	CAR
Kasein hydrolyzát	Fluka	
Kvasničný extrakt	OXOID	
Kyselina chlorovodíková	Lachema	HCl
Methanol	Lach:Ner	
Polyetylglykol (Mw = 8000)	Sigma	PEG
Sacharóza	Lach:Ner	
Síran hořečnatý	AppliChem	MgSO ₄ (H ₂ O) ₇

Tris(hydroxymethyl)aminmethan	Sigma	TRIS = TRIZMA BASE
Trypton	OXOID	
Teikoplanin	Sigma	TEI
Vankomycin hydrochlorid	Sigma	VAN

4.1.8 Komerční soupravy a standardy

Izolace plazmidové DNA z *E. coli* JM 109

Nucleobond® Xtra Midi/Maxi (Machinery-nagel)

Wizard® Plus SV Minipreps DNA purification System (Promega)

Izolace DNA z agarózového gelu a přečištění PCR směsi

Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega)

Standard molekulové hmotnosti u DNA agarózové elektroforézy

1 kb Plus DNA ladder (Invitrogen). Standard obsahuje fragmenty od 100 bp do 12000 bp. 5 µl vzorek standardu obsahuje fragment o velikosti 1650 bp 40 ng DNA. Pomocí tohoto standardu můžeme odečítat přibližnou koncentraci vzorků DNA.

Příprava pracovního roztoku:

- 100 µl 1 kb Plus DNA ladder
- 100 µl 10 DNA vzorkový pufr
- 800 µl TE⁻¹ pufru

4.1.9 Počítačová analýza

CLC Main Workbench 6. 8. 1. – program na analýzu sekvencí, tvorba fylogenetického stromu z proteinových sekvencí

Gen5 2.01 – program zaznamenávající naměřené hodnoty z destičkového spektrofotometru (Biotek Synergy HT)

ImageLab 5.0 – program pro univerzální dokumentační systém, v kterém byly zobrazeny a upraveny snímky elektroforetogramů pořízené na přístroji ChemiDoc™ MP Imaging system (BIO-RAD)

Olympus fluoview Ver. 2. 0a Viewer – analýza mikroskopických snímků

ExPaSy – internetová stránka, jenž slouží jako bioinformatický zdrojový portál. V této diplomové práci bylo využito nástroje překladu nukleotidové sekvence na aminokyslečinovou - <http://web.expasy.org/translate/>

BLAST – internetová stránka pro porovnávání sekvencí - <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>

KEGG analýza sekvencí DNA - <http://www.genome.jp/kegg/>

Phobius – server pro predikci proteinů kombinující predikci transmembránové topologie a signálních peptidů - <http://phobius.sbc.su.se/>

Predict Protein – server pro predikci možné podoby proteinu z aminokyselinové sekvence - <https://www.predictprotein.org/>

4.2 Metody

4.2.1 Bioinformatická analýza

Porovnání dvou proteinů VanZ_{Tei} (kódovaný genem v rezistenčním genovém klastru) a VanZ_g (jehož sekvenci kóduje gen vanZ nacházející se na chromosomální DNA *E. faecium*) proběhlo pomocí blast programu nastavením sekvenčního párovacího aligmentu (Needleman - Wunsch aligment dvou AK sekvencí). Pomocí programu blastp byly vyhledávány nejbližší homologní proteiny. Prvních 100 nejbližších homologních sekvencí bylo importováno do programu CLC Main Workbench 6. 8. 1., v němž byl vytvořen aligment a následně fylogenetický strom s vyznačením umístění proteinů VanZ_{Tei} a VanZ_g. Fylogenetický strom byl vytvořen metodou UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic mean) neboli shlukovací analýzou. První jsou seřazeny nejpodobnější sekvence, k takovému páru se přirovnává další nejbližší sekvence, dokud nejsou použity všechny sekvence. Následně jsou aligmenty hierarchicky seřazeny a vzniká fylogenetický strom.

K predikci sekundárních struktur proteinů VanZ_{Tei} a VanZ_g byl využit internetový server PredictProtein a Phobius. PredictProtein kombinuje celou řadu metod a databází k predikci transmembránových α -helixů, coiled-coil oblastí, dostupnosti k rozpouštědlům, přítomnost vazebných domén (protein-protein, DNA vazebné), buněčnou lokalizaci a mnoho dalších charakteristik. Phobius je online program, který integruje predikci transmembránové topologie s predikcí signálního peptidu.

4.2.2 Kultivace a uchovávání bakterií

***E. coli* JM109**

Buňky *E. coli* JM109 byly kultivovány buď v LB médiu, za stálého třepání 200 rpm při 37 °C po dobu 18 hodin, nebo na miskách obsahující LB agar, při 37 °C přes noc. V případě potřeby selekce buněk s vloženými plazmidy byla přidána příslušná antibiotika. Pro dlouhodobé uchování buněk byly jednotlivé kolonie resuspendovány v 10% glycerolovém roztoku a uloženy do -80 °C.

***Staphylococcus aureus* RN4220**

Buňky *S. aureus* RN4220 byly kultivovány v BHI médiu, za stálého třepání 200 rpm v teplotě 37 °C, 18 hodin. Jejich kultivace také probíhala na pevné půdě s BHI agarem, při 37°C 24 hodin. Kmeny obsahující vložené plazmidy byly kultivovány se selekčním antibiotikem. Bakteriální kmeny kultivované na pevných půdách byly krátkodobě uchovávány ve 4 °C. Bakteriální kmen *S. aureus* RN4220 byl dlouhodobě uchováván při teplotě -80°C v 10% glycerolovém roztoku.

***Enterococcus faecium* E1162**

Bakteriální kmen *Enterococcus faecium* E1162 byl dlouhodobě uchováván v -80 °C v 10% glycerolovém roztoku. Jeho kultivace probíhala na pevných půdách s BHI agarem při 37 °C, 24 - 48 hodin nebo v tekutém BHI médiu v třepačce při 37°C, při otáčkách 200 rpm po dobu 18 hodin. Pro selekci buněk obsahující vložené plazmidy se používalo příslušné antibiotikum.

4.2.3 Příprava a transformace do kompetentních buněk

***E. coli* JM109**

1. Příprava kompetentních buněk: 1 ml bakteriálních buněk, které rostly přes noc, bylo inokulováno do 100 ml LB média obohaceného o 10mM MgSO₄ a 0,2% glukózy. Kultura se nechala růst při 37 °C za stálého třepání (200 rpm) do optické density OD₆₀₀ = 0,4 – 0,6. Poté se kultura po dobu 10 minut chladila v ledové lázni a následně byly buňky centrifugovány (1750 g, 10 min, 4°C). Buněčný pelet byl za neustálého chlazení v ledové lázni resuspendován v 1 ml obohaceného LB média. Následně se k buněčné suspenzi přidalo 5 ml předchlazeného média pro uchovávání kompetentních buněk a opatrně se obsah promíchal. Následně byla směs kompetentních buněk s médiem rozdělena po 100 µl alikvótách a zmrazena v – 80 °C.
2. Transformace DNA do kompetentních buněk teplotním šokem: Ke 100 µl kompetentních buněk bylo přidáno 10 µl ligační směsi a následně se buňky nechaly inkubovat 30 min na ledu. Poté se buňky vystavily teplotnímu šoku 42°C po dobu 1 min, a poté byly inkubovány na ledu po dobu 1 min za současného přidání 1 ml LB média. Následovala inkubace buněk při 37°C po dobu 1 hodiny a 15 minut. Poté byla transformační směs zcentrifugována (2500 g, 1 min) a nadbytek LB média byl odsát, tak aby zůstalo přibližně 100 µl buněčné suspenze. Buňky byly resuspendovány vysety na misky s LB agarem a příslušným selekčním antibiotikem pro selekci plazmidu. Následovala inkubace přes noc při 37 °C v termostatu.

***Staphylococcus aureus* RN4220**

1. Příprava kompetentních buněk: 500 µl bakteriální kultury, která rostla přes noc, byla inokulována do 50 ml BHI média a při 37 °C rostla do $OD_{600} = 0,5 - 0,8$. Poté se kultura 10 minut chladila v ledové lázni a následně byla stočena (8000 g, 10 min, 4°C). Buňky byly promyty 50 ml deionizované vody, centrifugovány (8000 g, 10 min, 4°C), následně promyty ve 20 ml 10% roztoku glycerolu, zcentrifugovány (8000 g, 10 min, 4°C) a odstředěné buňky byly resuspendovány v 5 ml 10% glycerolového roztoku. Buněčná suspenze byla inkubována 15 minut při laboratorní teplotě. Buňky byly stočeny (8000 g, 15 min, 4 °C) a resuspendovány v 0,8-1 ml 10% glycerolovém roztoku. Následně byla směs kompetentních buněk rozdělena po 50 µl alikvótách a zmrazena v – 80 °C.
2. Transformace DNA do kompetentních buněk elektroporací: 25 µl kompetentních buněk bylo 10 minut inkubováno v ledové lázni, po této inkubaci bylo k buňkám přidáno 5 µl plazmidové DNA. Při laboratorní teplotě se buněčná směs nechala inkubovat po dobu 10 minut. Následně byla přenesena do vychlazených elektroporačních kyvet a vystaveny elektrickému pulsu (300V; 2 s). Po elektroporaci bylo k buněčné směsi ihned přidáno B₂ médium a směs se dala na 10 minut chladit. Následovala inkubace buněk při 37°C po dobu 1 hodiny a 15 minut. Poté byla transformační směs zcentrifugována (2500 g, 1 min) a nadbytek B₂ média byl odsát, tak aby zůstalo přibližně 100 µl buněčné suspenze, která byla nanesena na misky s BHI agarem a selekčním antibiotikem. Následovala inkubace přes noc při 37 °C v termostatu.

Enterococcus faecium E1162

1. Příprava kompetentních buněk: 200 ml bakteriální kultura, která rostla 24 hodin v BHI médiu, byla rozdělena do 50 ml zkumavek. Tato buněčná suspenze byla inkubována na ledě 15 minut a následně stočena (1750 g, 10 minut, 4 °C). Pelet byl 3x promyt na ledu chlazeným 10% glycerolem. Následně byly buňky resuspendovány v 10 ml chlazeného 10% glycerolu. Bakteriální kultura byla odstředěna (1750 g, 10 minut, 4 °C) a resuspendována v 500 µl chlazeného 10% glycerolu. Kompetentní buňky byly po 100 µl alikvótách uchovány v -80 °C.
2. Transformace DNA do kompetentních buněk elektroporací: Ke 100 µl kompetentních buněk byly přidány 3 µl plazmidu a byla inkubována na ledu po dobu 30 minut. Poté byla buněčná suspenze přenesena do elektroporačních kyvet, v kterých byly buňky vystaveny elektrickému pulsu (1,6V; 2s). Po tomto pulsu bylo k buňkám přidáno BHI médium (1 ml) a kultura byla kultivována 3 hodiny při 37 °C. Po kultivaci byla kultura

stočena při 2500 g po dobu 2 minut. Pelet byl resuspendován ve 200 µl BHI média a 50 µl z této buněčné směsi bylo vyseto na BHI agar obsahující selekční antibiotikum. Kultivace probíhala 24 - 48 hodin, v termostatu při 37 °C.

Pozn. Elektroporace byla prováděna vždy v elektroporátoru Biorad MicroPulserTM.

4.2.4 Polymerázová řetězová reakce PCR

Amplifikace genů *vanZ_{Tei}*, *vanZ_{Tei} his tag*, *vanZ_g* a *vanZ_g his tag*

Složení PCR reakce

5x HF Phusion pufr	10 µl
Phusion polymeráza HF	1,25 µl
dNTPs mix	2 µl
Primer F	2 µl
Primer R	2 µl
Templátová DNA	1 µl
Destilovaná H ₂ O	31,75 µl

Pro *vanZ_{Tei}*, *vanZ_{Tei} his tag* byl využit plazmid pAT398 (obsahuje *vanA* rezistenční klastr *vanRSHAXYZ*, získáno od Patrice Courvalin (Institute of Pasteur) jako templátová DNA. Pro *vanZ_g*, *vanZ_g his tag* byla využita chromozomální DNA z *Enterococcus faecium* jako templátová DNA pro PCR reakci. Primery byly vždy specifické pro danou reakci a jsou uvedeny v tabulce č. 1. Reakce o objemu 50 µl proběhly v PCR cycleru (My Cyclor Bio-rad) dle níže uvedeného schématu.

Průběh PCR reakce

Primární denaturace 95 °C	2 min	
Denaturace 95 °C	20 s	} 35 opakování
Nasednutí primerů 60 °C	30 s	
Elongace primerů 72 °C	45 s	
Finální elongace 72 °C	5 min	

Kontrolní PCR pro ověření přítomnosti inzertu v plazmidu pRMC2

Pro ověření inzertu u transformovaných kolonií *Staphylococcus aureus* RN4220 byla provedeno kontrolní PCR s využitím primerů pRMC2 F a pRMC2 R, které nasedají na pRMC2 vektor v místech ohraničujících vložený inzert.

Složení kontrolní PCR reakce

5x HF Phusion pufr	10 μ l
Phusion polymeráza HF	0,5 μ l
dNTPs mix	1 μ l
pRMC2 F	1 μ l
pRMC2 R	1 μ l
Templátová DNA	Odebrání malého množství z jedné kolonie
50 mM MgCl ₂	1 μ l
DMSO	1 μ l
Destilovaná H ₂ O	35 μ l

Reakce o objemu 50 μ l proběhly v PCR cycleru (My Cycler Bio-rad) dle níže uvedeného schématu.

Průběh kontrolní PCR reakce

Primární denaturace 98 °C	10 min	
55 °C	3 min	→ Přidána Phusion polymeráza HF
72 °C	1 min	
Denaturace 95 °C	20 s	} 30 opakování
Nasednutí primerů 60 °C	30 s	
Elongace primerů 72 °C	45 s	
Finální elongace 72 °C	5 min	

4.2.5 Elektroforéza DNA v agarózovém gelu

V experimentální části pro vizualizaci a analýzu velikosti DNA fragmentů byla využita rychlá metoda agarózové elektroforézy. Byl použit 1% agarózový gel rozpuštěný v 1x TAE pufru do něhož byl přidán ethidium bromid nebo fluorescenční barva Green Safe Premium o konečné koncentraci 0,006% za účelem vizualizace pod UV světlem. Před nanesením vzorku byl vzorek smíchán s 1/10 objemu 10x koncentrovaného vzorkového pufru. Jako velikostní standard byl použit 1 kb Plus DNA ladder (Invitrogen). Fragmenty byly separovány při konstantním napětí 3-5V/cm.

4.2.6 Izolace DNA

Izolace DNA z agarózového gelu

Požadované fragmenty byly z agarózového gelu vyříznuty a přečištěny pomocí komerční soupravy Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega). Při čištění se postupovalo dle pokynů v návodu výrobce.

Izolace plazmidové DNA z kmene *E. coli* JM109

Pro přípravu plazmidové DNA byly používány soupravy Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System (Promega) a NucleoBond® Xtra Midi/Maxi (Machinery-nagel). Při izolaci se postupovalo podle návodu výrobců.

Izolace chromozomální DNA z kmene *Enterococcus faecium*

V 900 µl Cell Lysis buffer (z komerčního kitu Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System) byly resuspendovány buňky rozčárkovaného kmene *E. faecium*. Do směsi bylo přidáno 100 µl lysozymu rozpuštěného v TES (10 mg/ml) a následně byla směs inkubována 30 minut při 37 °C. Po inkubaci se k buněčné směsi přidalo 140 µl 5% SDS a 20 µl proteinázy K rozpuštěné v TES (10 mg/ml) a 20 µl ribonukleázy A (10 mg/ml). A tato směs byla inkubována 30 minut v 55 °C. Po inkubaci bylo přidáno 333 µl 5M NaCl a lyzát byl centrifugován (16 000 g, 15 minut). DNA byla precipitována přidáním 0,7 objemu isopropanolu a následnou inkubací po dobu 10 minut ve 4 °C. Směs byla stočena (16 000 g, 15 min). Supernatant byl odstraněn a pelet byl promyt 1 ml 70% ethanolu. Po stočení (16 000 g, 5 minut) byl odstraněn supernatant a pelet byl vysušen v rotační vakuové odparce. Následně byl pelet resuspendován v 50 µl destilované vody. Kontrola izolace byla provedena na agarózové elektroforéze a následně byl vzorek chromozomální DNA zmražen (-20 °C). Metoda byla převzata a upravena od Novotná a kolektivu (2005).

4.2.7 Štěpení DNA fragmentů pomocí restrikčních endonukleáz

Restrikční endonukleázy typu II jsou enzymy rozpoznávající specifické místo na dsDNA a dokážou jí štěpit za vzniku fragmentů s definovanými konci. V experimentální části byly použity restrikční enzymy uvedené v kapitole 4. 1. 5 firmy New England Biolabs, pufr byl použit od stejné firmy. Při štěpení restrikčními enzymy byly dodrženy pokyny výrobce a reakce probíhaly po dobu 1 hodiny v 37 °C. Tato metoda sloužila k upravení konců inzertů, linearizování vektora a také k ověřování správného zaligování inzertu do konstruktu.

Po štěpení DNA následovala agarózová elektroforéza pro ověření správnosti restrikce.

4.2.8 Ligace upravených inzertů do pRMC2

Ligaci linearizovaných molekul DNA provádějí enzymy ligázy, které slouží jako katalyzátor reakce. K ligaci byla použita T4 DNA ligáza (Fermentas) v reakční směsi o celkovém objemu 20 µl. Pro ligaci byl použit molární poměr mezi vektorem a inzertem 1:3. Součástí ligační směsi byl T4 DNA pufr dodávaný výrobcem spolu s enzymem. Reakční směsi pro všechny inzerty byly inkubovány při laboratorní teplotě 1 hodinu, ale i v paralele ve

4 °C přes noc. Pro inzert *vanZ_{Tei}* byla vhodnější delší inkubace při nižší teplotě. Pro ostatní fragmenty postačila jednohodinová inkubace. Následně byla ligační směs transformována do kompetentních buněk *E. coli* JM109.

4.2.9 Sekvenování DNA

Sekvenování DNA bylo prováděno v GATC Biotech (Německo). K sekvenaci byla posílána buď plazmidová DNA o koncentraci 40 – 80 ng/μl nebo produkty PCR amplifikace o koncentraci 19 – 45 ng/μl spolu s příslušnými oligonukleotidy. Vyhodnocení sekvenací bylo provedeno v programu CLC Main Workbench 6. 8. 1.

4.2.10 Stanovení citlivosti na antimikrobiální látky

Citlivosti k antibiotikům byly testovány diluční mikrometodou dle Urbáškové (1997) v mikrotitračních destičkách s MH médiem obsahující ředící řadu testovaných antibiotik: teikoplanin, vankomycin, dalbavancin, MA79, SKA30, ERJ390, ERJ384, karbenicilin, gentamicin, erythromycin. Testované koncentrace antibiotik byly připraveny dle tabulky č. 3. Rozpětí testovaných koncentrací antibiotik byly v rozmezí 0,5 - 32 μg/ml pro teikoplanin a vankomycin a pro ostatní antibiotika v rozmezí 0,125 - 8 μg/ml. V každé jamce byl vždy přítomen chloramfenikol (10 mg/ml) pro udržení kmenů s plazmidem pRMC2 a anhydrotetracyklin (100 ng/ml) pro indukci exprese rezistenčních genů. Používaná koncentrace anhydrotetracyklinu (100 ng/ml) je považována za optimální na základě zkušeností s expresí jiných rezistenčních genů ve *S. aureus* RN4220 v naší laboratoři (Vimberg et al., 2015).

Inokulum buněk testovaných kmenů bylo připraveno resuspendováním několika přes noc narostlých kolonií do 2 ml fyziologického roztoku tak aby výsledný zákal odpovídal hodnotě 1 McFarland. Do každé jamky obsahující 100 μl MH média s příslušnými antibiotiky bylo zaočkováno 5 μl inokula. Destičky byly inkubovány v termostatu při 37 °C po dobu 24 hodin. Růst buněk byl vyhodnocován na základě měření optické denzity (OD₆₀₀) destičkovým spektrofotometrem (Biotek Synergy HT). Minimální inhibiční koncentrace byly stanoveny odečtem optické denzity na začátku a na konci měření, kterým jsme určili inhibici růstu. Minimální inhibiční koncentrace byly stanoveny ve čtyřech nezávislých měření přičemž každé měření bylo provedeno ve dvou paralelách. Kontrolním kmenem byl *S. aureus* obsahující prázdný vektor pRMC2.

Příprava zákalových standardů McFarlanda

Zákalové standardy byly připraveny podle následující tabulky č. 2 a nality v objemu 2 ml do zkumavek o stejném průměru, jako měly zkumavky pro přípravu inokula testovaných kultur.

Tabulka 2 Příprava zákalových standardů McFarlanda (Urbášková, 1997)

Číslo standardu McFarlanda	Přidávaný objem		Přibližný odpovídající počet buněk / ml
	BaCl ₂ (1,175%)	H ₂ SO ₄ (1%)	
0,5	0,5 ml	99,5 ml	1,5 x 10 ⁸
1	1,0 ml	99,0 ml	3,0 x 10 ⁸
2	2,0 ml	98,0 ml	6,0 x 10 ⁸

Tabulka 3 Ředění antibiotik

Počáteční koncentrace antibiotika (mg/ml)	ATB (μl)	Dest. H ₂ O nebo ethanol* (μl)	Pracovní koncentrace ATB (mg/ml)	ATB (μl)	MH médium (μl)	Konečná koncentrace ATB (μg/ml)
10	-	-	10	2,24	700	32
10	-	-	10	1,12	700	16
10	10	90	1	5,6	700	8
10	10	90	1	2,8	700	4
10	10	90	1	1,4	700	2
1	10	90	0,1	7	700	1
1	10	90	0,1	3,5	700	0,5
1	10	90	0,1	1,75	700	0,25
1	10	90	0,1	0,875	700	0,125
-	-	-	-	0	700	0

* Antibiotika rozpustná v H₂O: teikoplanin, vankomycin, karbenicilin a gentamicin, MA79, ERJ390. Antibiotika rozpustná v ethanolu: erythromycin, dalbavancin, SKA30, ERJ384.

4.2.11 Testování aktivity fúzních proteinů VanZ_{Tei} *his tag* a VanZ_g *his tag*

Aktivita fúzních proteinů byla ověřena stanovením MIC pro teikoplanin a vankomycin (rozmezí koncentrací 0,5 - 32 μg/ml) a porovnáním hodnot MIC mezi kmeny exprimující fúzní proteiny s kmeny exprimující proteiny nemodifikované. Nejprve probíhalo stanovení citlivostí stejným způsobem a za stejných podmínek jako v kapitole 4. 2. 9. Na základě výsledků prvního měření byly pro další testování citlivostí použity různé koncentrace induktoru exprese anhydrotetracyklinu (0; 10; 50; 100; 200 ng/ml). Kromě toho byl

porovnáván i růst u kmene *S. aureus* RN4220 VanZ_g pRMC2, *S. aureus* RN4220 VanZ_g his tag pRMC2 s kmenem *S. aureus* RN4220 pRMC2 v různých koncentracích anhydrotetracyklinu (0, 10, 50, 100, 200 ng/ml) po dobu 24 hodin. Růst byl měřen po 2, 6 a 24 hodinách inkubace ve 37 °C. Všechny testy byly provedeny v přítomnosti chloramfenikolu (10 mg/ml) pro udržení plazmidů.

4.2.12 Mikroskopie

Pro sledování změn vazby glykopeptidů na buňku působením proteinů VanZ bylo využito dvou značených antibiotik, fluorescenčně značený BODIPY® FL Vankomycin (zelený fluorescenční barvivo, excitační maximum 503 nm a emisní maximum 512 nm) a s rhodamin B isothiokyanátem konjugovaný teikoplanin (excitační maximum 543 nm a emisní maximum 580 nm).

Buňky natransformovaných kmenů *S. aureus* RN4220 (s *vanZ*_{Tei} pRMC2, *vanZ*_g pRMC2, a s prázdným pRMC2) byly pozorovány konfokálním mikroskopem OLYMPUS FV-1000 (FluoView™ FV1000 Scanning Unit with the IX81 Inverted Microscope) optimalizovaným pro FRAP, FLIP, a vybavený modulem TIRF a SIM. Byly použity metody klasické laser-skenovací mikroskopie (LSM) v konfokální rovině a Nomarski diferenciálního interferenčního kontrastu (DIC). Sledování současně DIC s LSM nemá vliv na kvalitu fluorescenčního obrazu. Snímky z mikroskopování byly pořízené oběma metodami a následně sloučeny dohromady v programu Olympus fluoview Ver. 2.0a Viewer.

Buňky, na mikroskopování, byly připraveny dvěma způsoby. Jedním způsobem byla kultivace buněk v čistém BHI médiu pouze s chloramfenikolem (10 mg/ml) a anhydrotetracyklinem (100 ng/ml). Druhý způsob tkvěl v přidání subinhibiční koncentrace teikoplaninu. Pro kmen *S. aureus* RN4220 VanZ_{Tei} pRMC2 byla koncentrace teikoplaninu 0,5 µg/ml, pro *S. aureus* RN4220 VanZ_g pRMC2 2 µg/ml a pro kmen obsahující prázdný vektor *S. aureus* RN4220 pRMC2 0,25 µg/ml.

Kultivace probíhala do dosažení hodnoty OD₆₀₀ = 0,4. Poté byla kultura naředěna na OD₆₀₀ = 0,05 a následně kultivována do dosažení hodnoty OD₆₀₀ = 0,2. Kultivace probíhala ve 37 °C, za neustálého třepání (200 rpm). Poté byla kultura centrifugována a uchována v -80°C do doby, kdy byl mikroskopován. Toto opatření bylo z důvodu převozu vzorků, jelikož se mikroskop nenachází v budově naší laboratoře. Krátce před mikroskopováním byly bakterie inkubovány s fluorescenčně značenými antibiotiky (konečná koncentrace FL- ATB 20 µg/ml, 10 minut, při pokojové teplotě). Přebytek antibiotika, který se nenavázal, byl odstraněn při centrifugaci buněk (16 000 g, 1 min), odstraněním supernatantu. Buňky byly resuspendovány

v destilované vodě. Preparáty byly připravovány tak, že na krycí sklíčko byla přidána buněčná suspenze (10 μ l), která byla překryta tenkým kouskem 1% agarózy.

5 Výsledky

Cílem mé diplomové práce bylo porovnání vlivu dvou ortologních genů *vanZ_{Tei}* a *vanZ_g* na rezistenci ke glykopeptidovým antibiotikům. Gen *vanZ_{Tei}* je součástí z rezistenčního genového kladru *vanRSHAXYZ* udílející rezistenci ke glykopeptidům u enterokoků. Kladr je součástí transpozónu Tn1546, což umožňuje horizontální genový přenos kladru mezi jednotlivými druhy enterokoků. Gen označovaný jako *vanZ_g* je kódován chromosomálně a je specifický pro *E. faecium*. Identita aminokyselinových sekvencí proteinů kódovaných geny *vanZ_g* a *vanZ_{Tei}* je 46%. Jedná se o transmembránové proteiny, které několikrát prochází membránou a o jejichž funkci je známa pouze jedna skutečnost. Expres *VanZ_{Tei}* udílí nízkou hladinu rezistence k teikoplaninu u *Enterococcus faecalis* a to nezávisle na mechanismu rezistence ke glykopeptidovým antibiotikům, který udílí zbytek rezistenčního *vanHAXY* genového kladru modifikací dipeptidu na konci peptidoglykanového prekurzoru (Arthur et al, 1995). Mechanismus rezistence *VanZ_{Tei}* je tedy neznámý.

5.1 Bioinformatická analýza – predikce proteinů *VanZ_{Tei}* a *VanZ_g*, sekvenční analýza

VanZ proteiny tvoří velkou rodinu *VanZ* podobných proteinů (pfam04892). Jejich funkce je neznámá. Pro diplomovou práci byl vybrán protein *VanZ_g* (z chromosomální DNA *Enterococcus faecium*, identifikační č. WP_002321474.1 dle databáze NCBI) a protein *VanZ_{Tei}* (z rezistenčního genového kladru neseného transpozónem Tn1546 *Enterococcus faecium*, identifikační č. WP_000516404.1). Bioinformatická analýza poskytla informace o pravděpodobné topologii proteinů v membráně, konzervovanosti aminokyselinových zbytků, z které lze odvodit oblasti proteinu důležité pro funkci proteinu, a informace o fylogenetické příbuznosti ortologních proteinů a jejich zastoupení mezi bakteriemi.

5.1.1 Srovnávací alignent *VanZ_g* a *VanZ_{Tei}*

Prvním krokem analýzy bylo zjištění stupně homologie těchto dvou vybraných proteinů *VanZ_g* a *VanZ_{Tei}*. Z důvodu získání více vypovídajících údajů o homologii byly srovnávány aminokyselinové sekvence nikoliv nukleotidové sekvence. Při porovnávání *VanZ_{Tei}* a *VanZ_g* pomocí blast programu bylo využito sekvenčního párovacího alignentu (Needleman - Wunsch alignent dvou AK sekvencí), který udává 42% identitu obr. 13. Oba obsahují konzervovanou *VanZ* doménu.

Obrázek 13 Srovnávací alignment VanZ_g (Query) a VanZ_{Tei} (Sbjct).

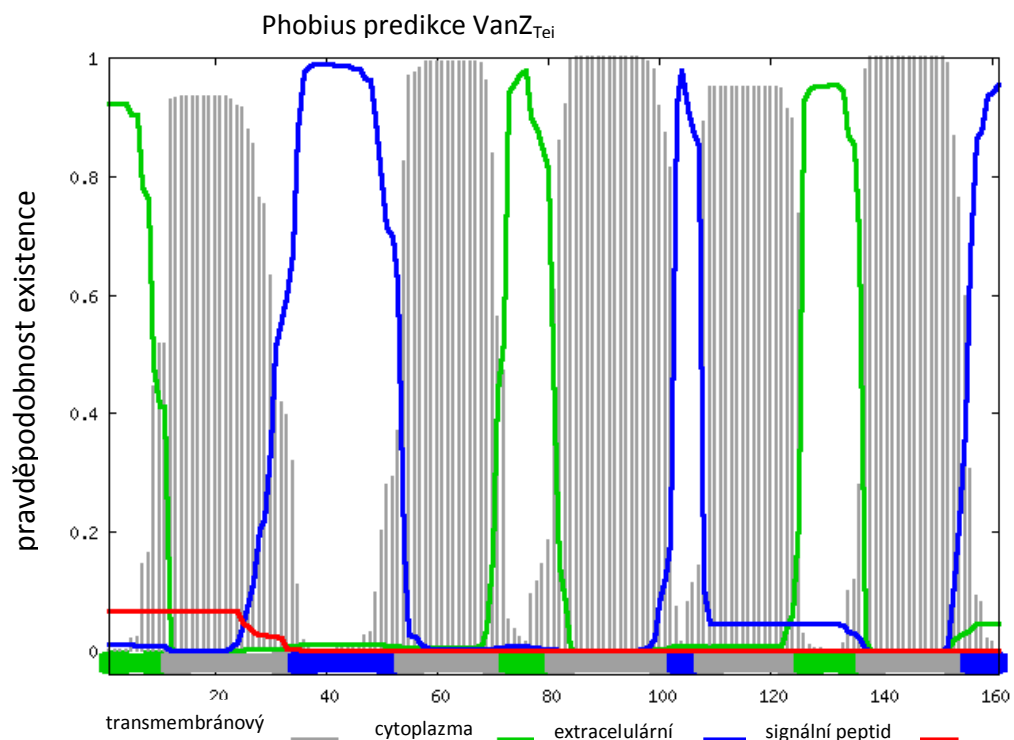
NW Score		Identities	Positives	Gaps
332		72/172(42%)	103/172(59%)	11/172(6%)
Query	1	MEEMSMRYVSKFLLGIYLFLLWLILFKLSFNLPQFLTYSYSNVNLVPFSTFSFENTTVL	60	
		M ++ +S+ LL +YL L+WL+LFLK +N+ Y ++NL PF+ T		
Sbjct	1	MGKI----LSRGLLALYLVTLIWLVLFKLQYNILSVFNHQRSLNLTPTFA-----TGNF	51	
Query	61	RETTYNLIVFFPFGVLLNVNFKRLSFSKKLGIIFLVSFLAELIQFLFGIGVADITDLITN	120	
		RE N+I+F PFG+LLNVNFK + F K + ++S E+IQF+F IG DITD+ITN		
Sbjct	52	REIDNVIIIFIPFGLLLNVNFKKEIGFLPKFAFVLVLSLTFEIIQFI FAIGATDITDVITN	111	
Query	121	TTGGLIGLWAYQLLNKHLSTNKLDRLAIIILGYILFLFLIVAFLLTRTVRLQ	172	
		T GG +GL Y L NKH++ KLDK+ I +G +L + L+V L +		
Sbjct	112	TVGGFLGLKLYGLSNKHMNQKKLDRV IIFVGILLVLLLVYRTHLR--IN YV	161	

Červeně zvýrazněné aminokyseliny jsou transmembránové a helixy (PredictProtein).

5.1.2 Sekundární struktura a membránová topologie

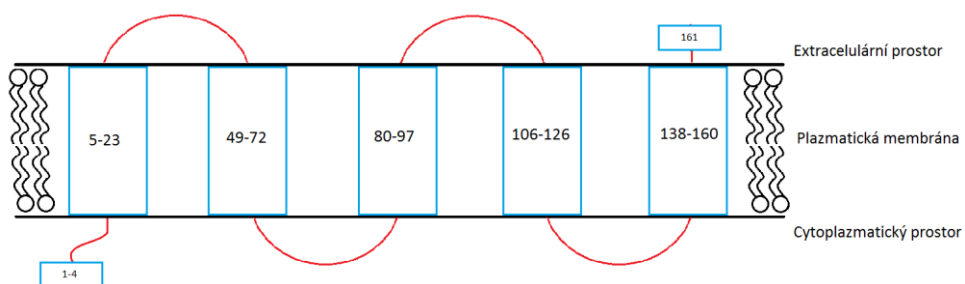
Sekundární struktura a membránová topologie byla předpovězena pomocí PredictProtein serveru, které umožňují predikci proteinu na základě vyhodnocování celé škály metod a porovnáváním výsledků s databázemi. Výsledkem této predikce je, že se jedná o transmembránové proteiny, které obsahují pět transmembránových helixů (červeně zvýrazněné aminokyseliny obr. 13). Dle predikce serveru PredictProtein není jasné jakým směrem transmembránové domény prochází membránou. Proto pro predikci topologie byl využit program Phobius, který pro navržení možné topologie proteinu také zohledňuje výsledky predikce signální sekvence (obr. č. 14 a 16). Schematické znázornění topologie proteinů VanZ_{Tei} a VanZ_g je na obrázcích č. 15 a 17.

Obrázek 14 Predikce topologie proteinu VanZ_{Tei} v membráně podle programu Phobius.

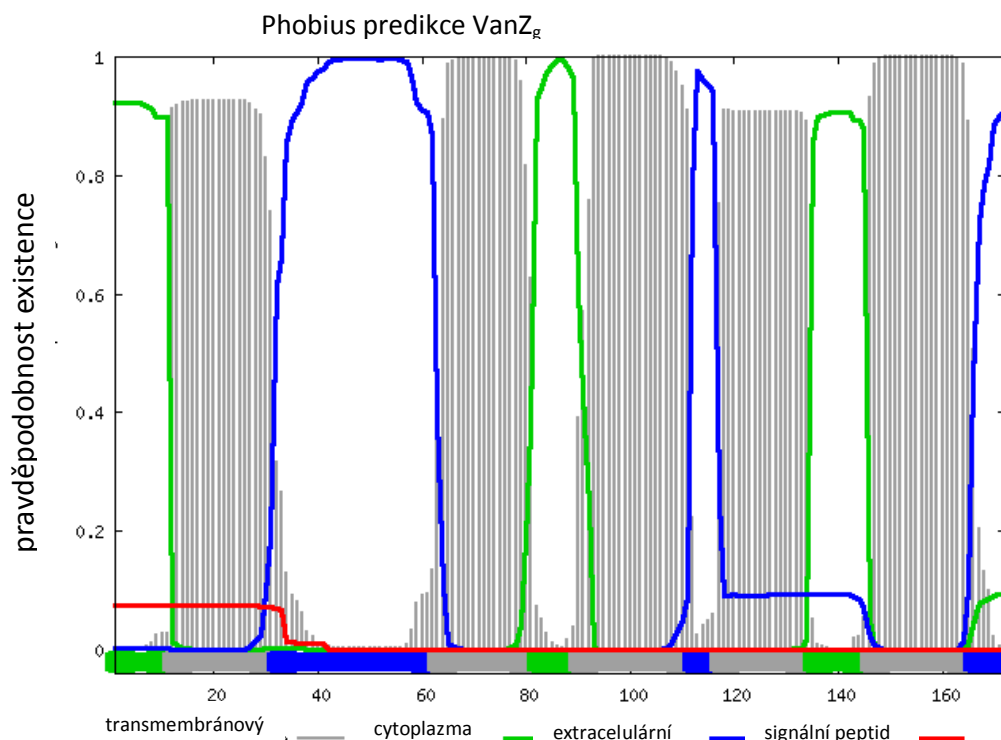


Vysvětlivky ke schématu predikce proteinu serverem Phobius: Na ose x je AK sekvence spolu s predikovanými částmi – signální peptid (červená čára), extracelulární část (modrá), transmembránová oblast (šedě šrafovaní) a cytoplazmatický prostor (zelená). Osa y udává pravděpodobnost existence (hodnota 0 udává neraálnou existenci, hodnota 1 reálnou existenci).

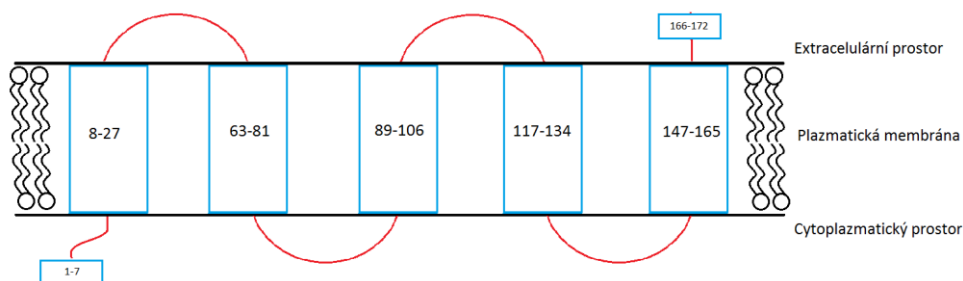
Obrázek 15 Schematické znázornění jedné topologie proteinu VanZ_{Tei} v membráně na základě predikce programem Phobius.



Obrázek 16 Predikce topologie proteinu VanZ_g v membráně podle programu Phobius.



Obrázek 17 Schematické znázornění predikované topologie proteinu VanZ_g v membráně podle programu Phobius.



5.1.3 Predikce oblastí proteinů VanZ_{Tei} a VanZ_g důležitých pro funkci

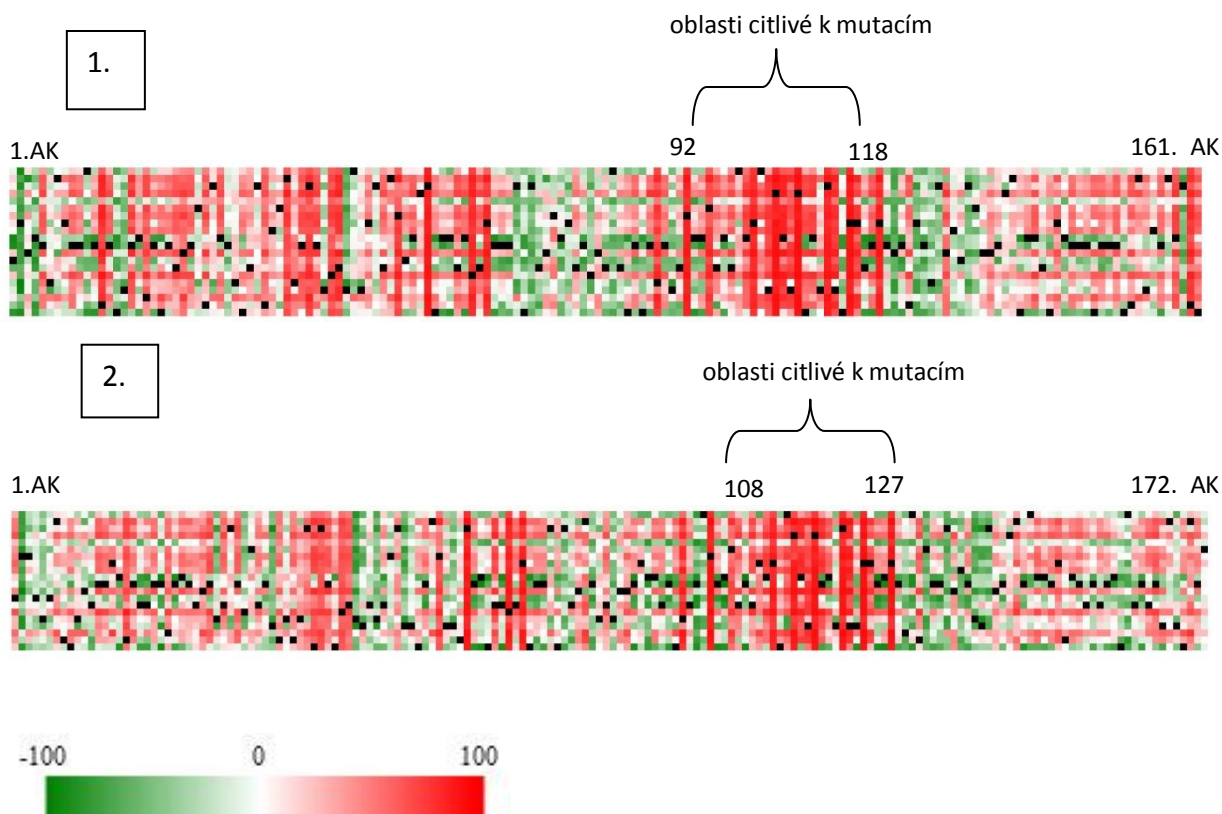
Server Predict Protein byl použit i pro předpovězení oblastí proteinu důležitých pro funkci. Konkrétně programem SNAP2 byla umožněna tato predikce. Program na základě arteficiální neuronové sítě předpovídá efekt bodové mutace v každé pozici proteinu pro každou z 19 aminokyselin. Existuje mnoho výpočetních nástrojů, které se zabývají předpovědí dopadu bodových mutací na funkci protein, ale ne všechny berou v potaz všechny možné kombinace aminokyselin. Tento nový program umožňuje rozšířit pohled na definici dopadu bodové mutace na protein. Studium míry dopadu různých variant může pomoci

s pochopením funkce a evoluce proteinu. Výsledkem predikce je barevná mapa (heat map) (obr. 18) se škálou barev od zelené k červené. Barva udává míru změny přítomnosti dané AK na funkci proteinu (zelená minimální vliv – červená podstatný vliv).

U míst, kde je předpovězen značný dopad mutací na funkci, lze považovat za funkčně důležitá místa. U VanZ_{Tei} se tato místa objevují od 38. AK po 45. AK, což je oblast nenacházející se v membráně. Pak je označeno několik jednotlivých aminokyselinových pozic, které jsou vždy součástí transmembránových helixů: 57, 92, 95. Potenciálně významná oblast pro funkci proteinu se nachází v AK pozicích 100 až 118. Tento úsek začíná mimo membránu a velká část je součástí 4. transmembránového helixu. Také na úplném C-konci proteinu se nacházejí dvě AK, které mohou být důležité pro funkci.

U VanZ_g se funkčně významné oblasti objevují od 44. AK po 50. AK, což je oblast mezi 1. a 2. transmembránovým helixem. Pak je označeno několik jednotlivých aminokyselinových pozic, které jsou součástí transmembránových helixů až na výjimku (62. AK je mimo transmembránový helix): 62, 66, 70, 72, 74, 97 a 101. Významnou funkční oblast vytváří AK na pozici 108 až 127. Tyto AK se z počátku nachází z větší části mimo membránu, ale konec sekvence je součástí čtvrtého transmembránového helixu. Pokud porovnáme tuto silně konzervovanou oblast s VanZ_{Tei}, zjistíme, že AK sekvence si jsou velmi podobné. Také na C konci proteinu se nacházejí předposlední dvě AK, které jsou významné pro úlohu proteinu, ale míra efektu na funkci není tak velká jako u VanZ_{Tei}.

Obrázek 18 Barevné mapy ukazující vliv bodové mutace na jednotlivé aminokyseliny v sekvenci VanZ_{Tei} (1.) a VanZ_g (2.) se zobrazením všech 20 možností aminokyselinové výměny.



Vysvětlivky:

Barevná škála přechází od zelené (-100) přes bílou (0) k červené (100), jednotlivé barevné čtverečky zobrazují jednu výměnu AK za druhou. Každý sloupec představuje jednu AK ze sekvence Červený čtvereček označuje, že tato výměna má velký účinek na funkci či strukturu proteinu. Zelený čtvereček označuje výměny, které neovlivňují podobu proteinu či jeho funkci. Černý čtvereček označuje výměnu za stejnou AK.

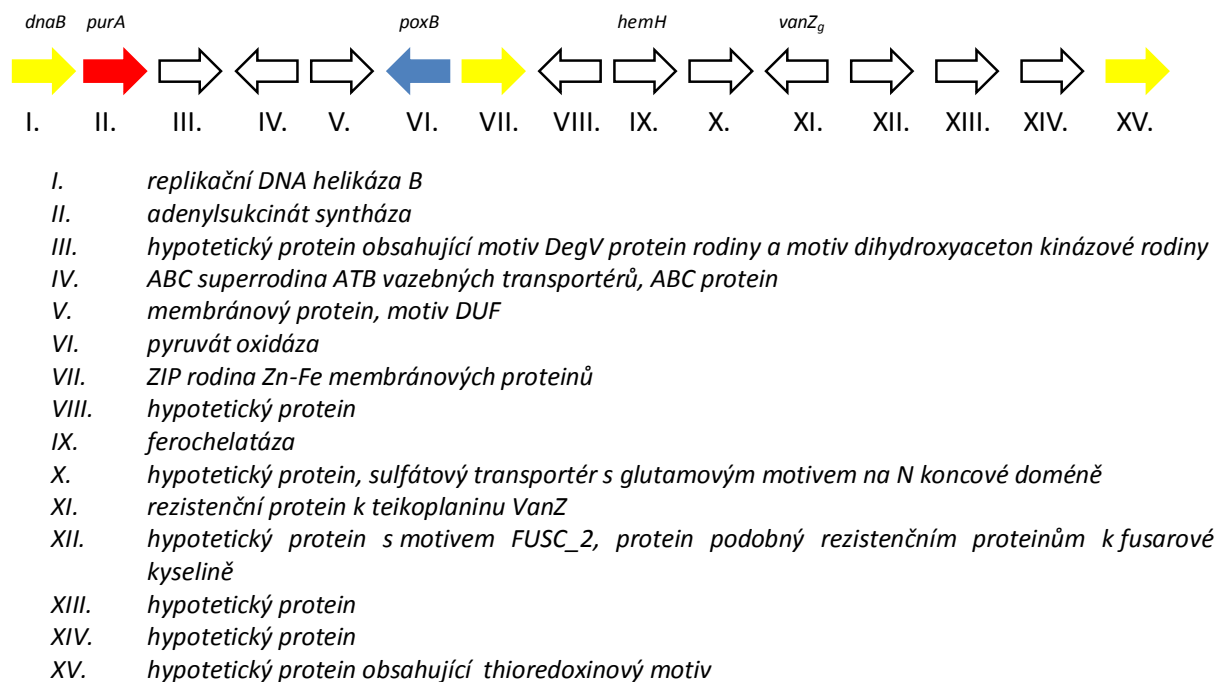
5.1.4 VanZ_g variabilita a genomický kontext

Protein VanZ_g se nachází u všech druhů *Enterococcus faecium*. S 51 druhy *E. faecium* má sekvenční identitu v rozpětí 90-100%. V genomech je anotovaný jako vanZ protein či VanZ podobný protein. Při hledání sta nejbližších homologů byl mimo kmen *Enterococcus faecium* nalezen homolog proteinu (s identitou 99%) u kmene *Clostridium difficile* Y384. Dále se vyskytovali i u: *Desulfosporosinus spp.*, *Bacillus spp.*, *Clostridium spp.*, *Enterococcus gilvus* a mnoho dalších s minimální identitou 35%.

Analýza okolí studovaného chromosomálně kódovaného genu může poskytnout informace o jeho funkci. Databáze KEGG (Genome database) rozpoznává klastr genů, opakující se u různých kmenů *E. faecium*. Genomické okolí genu vanZ_g je tedy poměrně konzervované. Genový klastr obsahuje 15 genů, přičemž funkce většiny z nich je neznámá (obr. 19). Nicméně na základě anotací je patrné, že okolní geny kódují transmembránové proteiny zahrnující transportéry a dokonce protein, který je podobný proteinu udílející

rezistenci k fusarové kyselině. Lze tedy předpokládat, že celá oblast se pravděpodobně účastní komunikace s vnějším prostředím, může vnímat např. stresové podmínky, ale také může vnímat a reagovat na antimikrobiální látky v prostředí. Což může naznačovat rezistenční funkci u *vanZ_g*.

Obrázek 19 Genová mapa okolí genu *vanZ_g* u *Enterococcus faecium* DO.

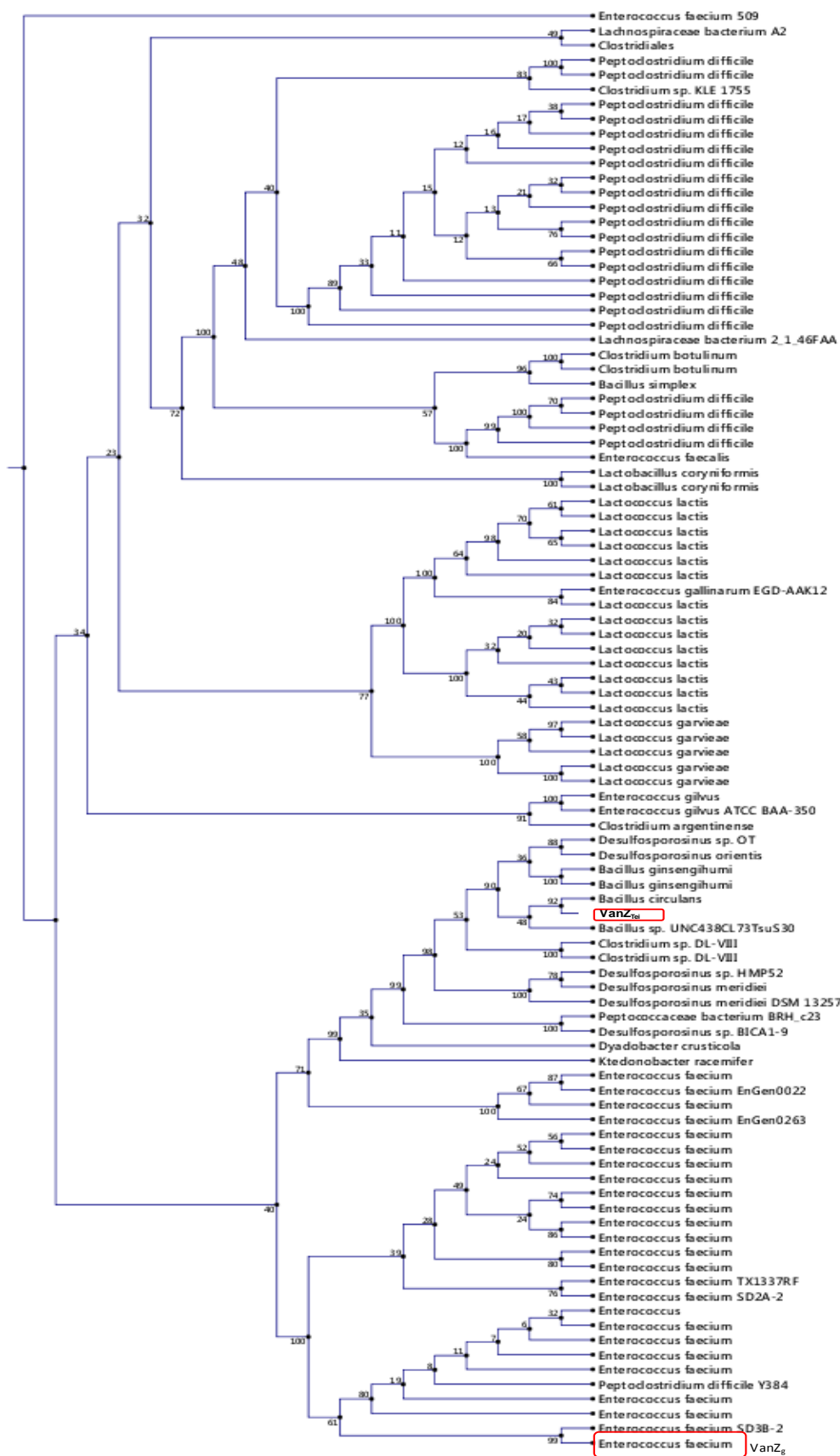


5.1.5 Fylogenetická analýza VanZ podobných proteinů

Jak už bylo zmíněno, tak existuje velká rodina VanZ proteinů, jejíž zástupci se objevují v celé řadě různých druhů bakterií. Pro lepší představu o vzájemné podobnosti nejbližších homologů proteinu VanZ_{Tei} byly z výsledků hledání homologních sekvencí programem blastp importovány sekvence jednoho sta nejbližších homologů do programu CLC Main Workbench 6. 8. 1. Sekvence byly v programu alignovány a následně byl metodou UPGMA vytvořen fylogenetický strom (obr. 20). Z fylogenetického stromu lze vypožorovat, že studované proteiny VanZ_{Tei} a VanZ_g vychází z jedné evoluční větve, lze tedy předpokládat podobnou funkci těchto proteinů.

Z fylogenetického stromu také vyplývá, že výskyt VanZ je druhově specifický, tj. že se vyskytuje u všech kmenů jednoho druhu, avšak není podmínkou, že se vyskytuje u všech druhů stejného rodu. Výsledky byly ověřeny i v KEGG databázi. Tak např. VanZ proteiny jsou přítomny u všech kmenů druhů *Enterococcus faecium*, *Streptococcus pneumonia*, *Streptococcus suis*, *Clostridium tetani*, *Clostridium botulinum*, *Lactococcus lactis subsp. lactis*, *Lactococcus lactis subsp. cremoris*, *Clostridium beijerinckii*, *Clostridium kluyveri*, *Peptoclostridium difficile*.

Obrázek 20 **Fylogenetický strom pro 100 nejbližších homologů VanZ_{Tei}.**



5.2 Příprava konstruktů pro expresi ve *Staphylococcus aureus* RN4220, *Enterococcus faecium* E1162

Abychom mohli studovat funkci proteinů VanZ_{Tei} a VanZ_g nebo jaký je jejich účinek na buňku, bylo nutné připravit kmeny, které budou kontrolovatelně exprimovat tyto dva proteiny. Jako hostitelé byly zvoleny kmeny *Staphylococcus aureus* RN4220 a *Enterococcus faecium* E1162. Expres v *E. faecium* E1162 umožní srovnání výsledků s dříve publikovanou prací týkající se rezistence udílené VanZ_{Tei} (Arthur et al, 1995). Protože však *E. faecium* obsahuje *vanZg* ve svém genomu, což by mohlo znemožnit pozorování některých fenotypových projevů exprese genů byl jako druhý hostitel zvolen *Staphylococcus aureus*, který žádný *vanZ* ve svém genomu nekóduje. Kromě toho informace o funkčnosti VanZ proteinů v *S. aureus* je důležitá z hlediska posouzení možnosti horizontálního přenosu *vanZ* genů z enterokoků do klinických izolátů *S. aureus*. Záměrem bylo připravit konstrukt umožňující expresi proteinů v obou hostitelích.

5.2.1 Příprava vektoru

Nejprve bylo zapotřebí zvolit vhodný expresní vektor, který by umožnil kontrolovatelně spouštět expresi vloženého genu. Vektor pRMC2 obsahuje inducibilní promotor, jenž je indukován tetracyklinem. V experimentální části byl použit netoxický homolog tetracyklinu, anhydrotetracyklin. Kromě toho pRMC2 obsahuje dva počátky replikace tak aby se propagoval jak v *E. coli* tak i v *S. aureus* což zjednodušuje celý proces klonování. Pro účely selekce obsahuje geny pro chloramfenikolovou rezistenci a ampicilinovou rezistenci (Corrigan & Foster, 2009).

Dalším krokem pro přípravu vektoru bylo vytvoření konstruktů obsahující sekvence obou genů. Pro amplifikaci genů pomocí PCR byly navrženy specifické oligonukleotidy (kap. 4. 1. 4). Ty obsahovaly přirozenou Shine–Dalgarnovu sekvenci pro lepší rozpoznávání start kodónu. Tudíž se Shine-Dalgarmova sekvence pro *vanZ_{Tei}* odlišovala od sekvence pro *vanZ_g*. Pro účely přesného vkládání amplifikovaného genu do vektoru, byly oligonukleotidy opatřeny dvěma různými restrikčními místy (EcoRI, SacI). Abychom mohli ověřit transmembránovou lokalizaci a jak protein prochází přes membránu, byly navrženy v kopii stejné oligonukleotidy, ale reverse primery obsahovaly před stop kodónem navíc sekvenci pro histidinovou kotvu. Histidinová kotva slouží k imunodetekci proteinu v buňce. Jako templátová DNA pro amplifikaci genů *vanZ_{Tei}* sloužil plazmid pAT398. Templátovou DNA pro amplifikaci genů *vanZ_g* byla chromosomální DNA *Enterococcus faecium*.

Linearizace vektoru pRMC2 a opracování konců amplifikovaných fragmentů s geny byla provedena restričními enzymy EcoRI a SacI. Fragmenty požadované délky (tab. č. 3) byly následně použity v ligační směsi spolu s linearizovaným vektorem pRMC2. Ligační reakce probíhala standardním postupem (kap. 4. 2. 8). Pouze v případě *vanZ_{Tei}* byla ligace účinná při delší inkubaci (přes noc) v ligační směsi při 4°C. Ligační směs byla transformována do *E. coli* JM109 (kap.4. 2. 3). Bakterie byly následně vysety na LB agar obsahující karbenicilin (100 µg/ml). Druhý den byly vyrostlé kolonie zaočkovány do LB média s karbenicilinem (100 µg/ml) pro izolaci plazmidové DNA z pomnožených buněk. Plazmidová DNA byla použita pro kontrolní restriční analýzu připravených vektorů, zdali obsahují vložené fragmenty. K analýze byly použity stejné restriční enzymy jako při postupu klonování. Plazmidy, u kterých byla ověřena délka vložených fragmentů, byly odeslány k sekvenaci. K ověření správné sekvence byly použity primery pRMC2 F a pRMC2 R lemující místo vloženého fragmentu. Takto byly připraveny všechny čtyři vektory uvedené v tabulce 4.

Tabulka 4 Délka fragmentů po štěpení restričními enzymy a celková délka vektoru s inzertem.

Označení vektoru	Délka fragmentu s upravenými konci (bp)	Délka výsledného vektoru (bp)
VanZ _{Tei} pRMC2	510	6933
VanZ _{Tei} his tag pRMC2	543	6966
VanZ _g pRMC2	553	6976
VanZ _g his tag pRMC2	586	7009
pRMC2	-	6423

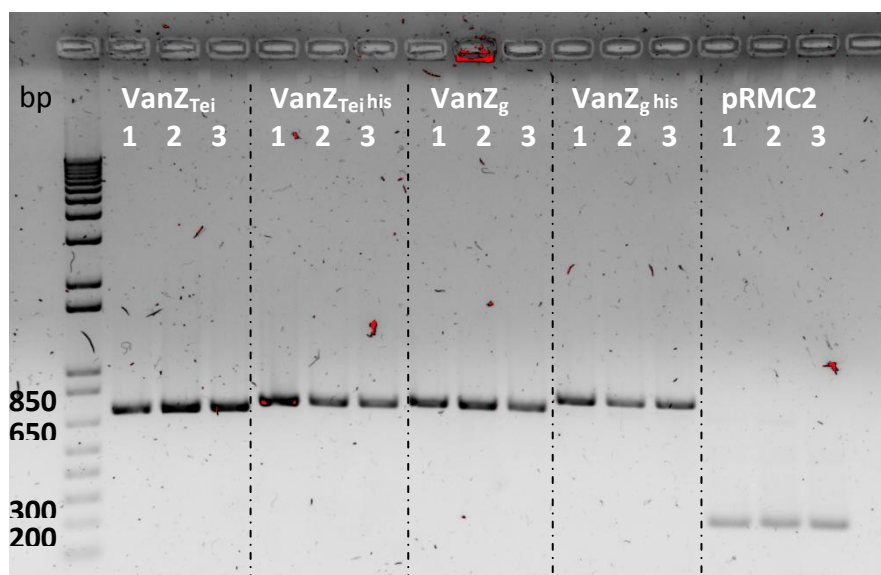
5.2.2 Transformace konstruktů do *Staphylococcus aureus* RN4220 a *Enterococcus faecium* E1162 a ověření transformant

Připravené konstrukty a kontrolní prázdný vektor pRMC2 byly elektroporovány do kmene *Staphylococcus aureus* RN4220 (kap. 4. 2. 3). Poté byly buňky vysety na misky s BHI agarem obsahující chloramfenikol jako selekční antibiotikum v koncentraci 10 µg/ml. Kultivace probíhala 24 hodin při 37°C. Narostlé kolonie byly ověřovány pomocí kontrolního PCR. K amplifikaci úseku obsahující vložené geny byly použity primery pRMC2 F a pRMC2 R, obklopující místo vložení. Velikost takto tímto způsobem amplifikovaných fragmentů uvádí tabulka č. 5. Na elektroforetogramu kontrolní PCR (obr. č. 21. bylo zjištěno, že vložení proběhlo správně. Otestované kolonie byly přeočkovány na BHI agar a druhý den byla připravena konzerva pro uchovávání (viz. kap.4. 2. 2).

Tabulka 5 Očekávané velikosti amplifikovaných úseků pomocí kontrolní PCR.

Název kmene	Předpokládaná velikost úseku (bp) amplifikovaného koloniovou PCR
<i>S. a.</i> RN4220 <i>vanZ_{Tei}</i> pRMC2	734
<i>S. a.</i> RN4220 <i>vanZ_{Tei} his tag</i> pRMC2	767
<i>S. a.</i> RN4220 <i>vanZ_g</i> pRMC2	777
<i>S. a.</i> RN4220 <i>vanZ_g his tag</i> pRMC2	810
<i>S. a.</i> RN4220 pRMC2	234

Obrázek 21 Elektroforetogram kontrolní PCR: Ověření vložení připravených vektorů do *Staphylococcus aureus*.



Připravené vektory byly také elektroporací transformovány do kompetentních bakterií kmene *Enterococcus faecium* E1162. Do dnešního dne připravené vektory, zmiňované v této diplomové práci, nebyly úspěšně transformovány do *E. faecium*. Za neúspěšnost elektroporace konstruktů do *E. faecium* může nejspíš nekompatibilita vektoru pRMC2 s tímto kmenem, jelikož ani prázdný vektor nebyl do *E. faecium* E1162 úspěšně vložen. Vektor pRMC2 byl speciálně navržen pro klonování do *S. aureus*, ale dosud nebylo známo, zda je tento vektor vhodný pro klonování do jiné gram-pozitivní bakterie. Lze to usuzovat z toho, že jiné kontrolní konstrukty (pAT396, pAT398, UP2TEXDOWN2, UPSALTEXDOWN2) se do kompetentních buněk podařilo úspěšně natransformovat. Po 48 hodinách růstu ve 37 °C (pro transformanty *E. faecium* s pAT396 a *E. faecium* s pAT398) a ve 30 °C (pro transformanty s UP2TEXDOWN2 a UPSALTEXDOWN2 konstruktem) na BHI agar s gentamicinem (125

μg/ml) bylo získáno mnoho transformovaných kolonií. Jak již bylo zmíněno, vektor pRMC2 byl zkonstruován pro účely klonování do *S. aureus*. Teprve v rámci této diplomové práce bylo testováno, zda jej lze použít i pro enterokoky.

5.3 Rezistenční fenotyp udílený geny *vanZ_{Tei}* a *vanZ_g*

Pro testování citlivosti kmenů k antibiotikům se používají dvě základní metody disková a diluční. Jelikož diluční metoda je kvantitativní a dává přesné údaje o citlivosti k antibiotikům, byla použita pro určování rezistenčního fenotypu kmenů *S. aureus* exprimující proteiny *VanZ_{Tei}* a *VanZ_g*. Stanovení minimální inhibiční koncentrace pro glykopeptidová antibiotika mikrodiluční metodou bylo provedeno ve čtyřech nezávislých měřeních, přičemž každé měření bylo uděláno ve dvou paralelách. MIC uvedená v tabulce č. 5, odpovídá stanovení, které se v paralele nejčastěji opakovalo. Anhydrotetracyklin byl použit v koncentraci 100 ng/ml ve všech měřeních jako induktor (Vimberg et al., 2015).

První testovanou skupinou antibiotik byla komerčně dostupná glykopeptidová antibiotika: teikoplanin, vankomycin a dalbavancin. Jak uvádí tabulka č. 6, měřením bylo neočekávaně zjištěno, že pouze přítomnost *VanZ_g* udílí rezistenci k teikoplaninu (4-8 μg/ml). Hodnoty MIC pro teikoplanin u kmene *S. aureus* RN4220 *VanZ_{Tei}* pRMC2 dosahovaly dvojnásobku MIC u kontrolního kmene. Ale stále to byly hodnoty 4-8 krát nižší než při expresi *vanZ_g*. Na rezistenci k vankomycinu se nepodílí ani jeden z proteinů kódovaných *vanZ*. Dalbavancin je nové lipoglykopeptidové antibiotikum, které má stejný mechanismus účinku jako vankomycin a teikoplanin a ke kterému dosud nebyla hlášena rezistence *in vivo*. Ale *in vitro* dalbavancin není účinný ke kmenům enterokoků s *vanA* rezistenčním klastrem a je méně účinný k enterokoků s *vanB* rezistenčním klastrem (Candiani et al., 1999). Přítomnost obou proteinů ovlivňuje citlivost k tomuto antibiotiku. *VanZ_g* snižuje citlivost čtyřikrát (MIC = 1 μg/ml) a *VanZ_{Tei}* dvakrát (MIC = 0,25 μg/ml).

Tabulka 6 MIC pro glykopeptidová antibiotika, nově syntetizovaná glykopeptidová antibiotika a kontrolní skupinu antibiotik.

Zařazení	Antibiotikum	MIC (µg/ml)			Testované rozpětí koncentrací (µg/ml)
		VanZ _{Tei} pRMC2 <i>S. a.</i>	VanZ _g pRMC2 <i>S. a.</i>	pRMC2 <i>S. a.</i>	
Glykopeptidová antibiotika	<i>Teikoplanin</i>	1	4-8	0,5	0-32
	<i>Vankomycin</i>	1	1	1	0-32
	<i>Dalbavancin</i>	0,25	1	0,125	0-8
Nově syntetizovaná glykopeptidová antibiotika	<i>MA79</i>	0,5	0,25	0,125	0-8
	<i>SKA30</i>	0,5	0,25-0,5	0,125	0-8
	<i>ERJ390</i>	0,5	0,25-0,5	0,125	0-8
	<i>ERJ384</i>	1	0,5	0,5	0-8
Kontrolní skupina antibiotik	<i>Karbenicilin</i>	0,125	0,125	0,125	0-8
	<i>Gentamicin</i>	1	1	1	0-8
	<i>Erythromycin</i>	0,125	0,125	0,125	0-8

Druhou skupinou testovaných antibiotik jsou nově syntetizovaná glykopeptidová antibiotika (MA79, SKA30, ERJ 390, ERJ384), které byla připravena na Vědecké univerzitě Lájose Kossutha v Debrecínu. Jejich struktura je podobná teikoplaninu a vankomycinu. Ze zjištěných hodnot MIC je patrné, že kmen *S. aureus* RN4220 VanZ_{Tei} pRMC2 je odolnější proti novým glykopeptidovým antibiotikům než kmen s proteinem *S. aureus* RN4220 VanZ_g pRMC2.

Poslední testovanou skupinou antibiotik byla kontrolní skupina neglykopeptidových antibiotik s odlišným mechanismem účinku. Karbenicilin je polysyntetický penicilin inhibující konečnou fázi syntézy buněčné stěny. Gentamicin je aminoglykosid, který se váže na malou ribozomální podjednotku a zastavuje syntézu proteinu. Erythromycin je makrolidové antibiotikum, které inhibuje syntézu proteinů vazbou na velkou ribozomální podjednotku. Z výsledků uvedených v tabulce je patrné, že proteiny VanZ_{Tei} a VanZ_g nemají schopnost k těmto antibiotikům udílet rezistenci.

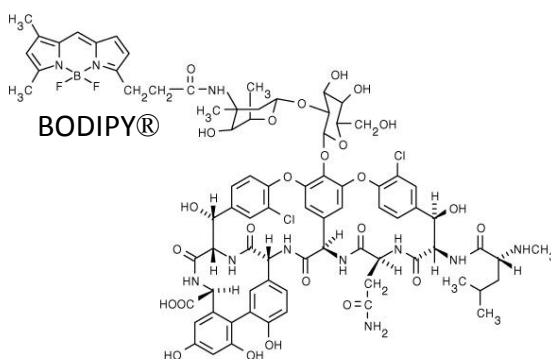
5.4 Vliv exprese genů *vanZ_{Tei}* a *vanZ_g* na vazbu fluorescenčně značených glykopeptidů na buňky

Pomocí fluorescenčně značených látek lze pozorovat *in vivo* jejich schopnost interakce s buněčnými strukturami. Pro sledování změn ve vazbě glykopeptidů na buňku působením

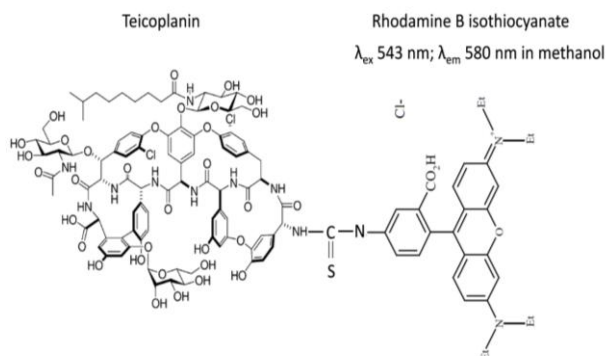
proteinů VanZ jsme využily fluorescenčně značený BODIPY® FL Vankomycin (FL-Van) (obr. 22) a teikoplanin konjugovaný s rhodamin B isothiokyanátem (FL-Tei) (obr. 23).

Zelený fluorescenční analog vankomycinu obsahuje jednu navázanou molekulu BODIPY® barvy. Fluorescenční značka je navázaná na amidové skupině disacharidu napojeného na čtvrté aminokyselině heptapeptidové kostry. Fluorescenčně značený teikoplanin byl připraven v naší laboratoři doktorem Radkem Gažákem, fluorescenční značka rhodamin B isothiokyanát byl napojen na první amidovou skupinu teikoplaninu.

Obrázek 22 Struktura BODIPY® FL Vankomycin



Obrázek 23 Struktura FL Teikoplaninu



Mikroskopické analýze byly podrobeny kmeny *S. aureus* RN4220 VanZ_{Tei} pRMC2, *S. aureus* RN4220 VanZ_g pRMC2 a *S. aureus* RN4220 pRMC2. Buňky na mikroskopování, byly připraveny dvěma způsoby uvedenými v kap. 4. 3. 12. Celkem tedy bylo připraveno šest různých buněčných kultur. Každá z těchto šesti buněčných kultur byla inkubována 10 minut s FL-Van a s FL-Tei. Celkem bylo mikroskopováno 12 různých preparátů a ze všech bylo pořízeno pět snímků LSM a DIC metodou. Obrázky 24 I-XII představují reprezentativní snímek pro každý pozorovaný preparát.

Na snímcích bylo pozorováno několik jevů, které byly následně pro každý kmen kvantifikovány. Jako počátek dělení (viz. obr. č. 24, jev A) je považován jev kdy je možné v buňkách pozorovat začínající syntézu septa. Druhým pozorovaným jevem je ukončená syntéza septa, kdy je patrné septum avšak buňky jsou stále ještě ve spojení (viz. jev B). Pozorováním těchto dvou jevů lze hodnotit právě probíhající syntézu peptidoglykanu, tedy cíl působení glykopeptidů. Lze tedy očekávat odlišnosti mezi citlivými a rezistentními buňkami. Další dva jevy, kterým byla věnována pozornost jsou: buňka plná antibiotika (viz. jev C), charakterizována přítomností signálu v celém svém objemu. Díky tomu jsou v takové buňce obtížně pozorovatelné jevy A a B. Jevo je pozorován téměř výhradně u buněk značených FL-Tei a může znamenat to, že buňka je lyzovaná. Posledním jevem, který byl sledován je situace

kdy není zaznamenán žádný fluorescenční signál tj. buňky neváží FL antibiotikum (viz. jev D) pozorovaný téměř výhradně u buněk značených FL-teikoplaninem.

Četnost pozorovaných jevů byla stanovena u všech preparátů jako počet buněk s daným jevem vztahený na celkový počet buněk preparátu a to na všech pěti snímcích pro každý preparát. Četnosti pozorovaných jevů jsou graficky znázorněny (Obr. 25 a 26). Kvantifikaci komplikovala zejména špatná viditelnost septa u buněk vyplněných antibiotikem. Protože jev kdy je buňka vyplněná antibiotikem je pozorován téměř výhradně u buněk značených FL-teikoplaninem je stádium a četnost dělicích se buněk (obr. 25A a B) mnohem lépe kvantifikována pomocí FL-Van (obr. 25 B). Proto v následujících dvou odstavcích budou popsány výsledky kvantifikace jevů týkajících se dělení buněk pouze u preparátů inkubovaných s FL-Van.

Buňky na počátku dělení (začínající syntéza septa) jsou u všech třech testovaných kmenů *S. aureus* RN4220 pRMC2, *S. aureus* RN4220 VanZ_{Tei} pRMC2, *S. aureus* RN4220 VanZ_g pRMC2 vždy více zastoupeny v případě, že buňky nebyly inkubovány s teikoplaninem (Obr. 25 B). Přítomnost teikoplaninu v médiu výrazněji snižovala frekvenci buněk se začínající syntézou septa pouze u kmenů s vanZ geny, nikoli však u divokého typu.

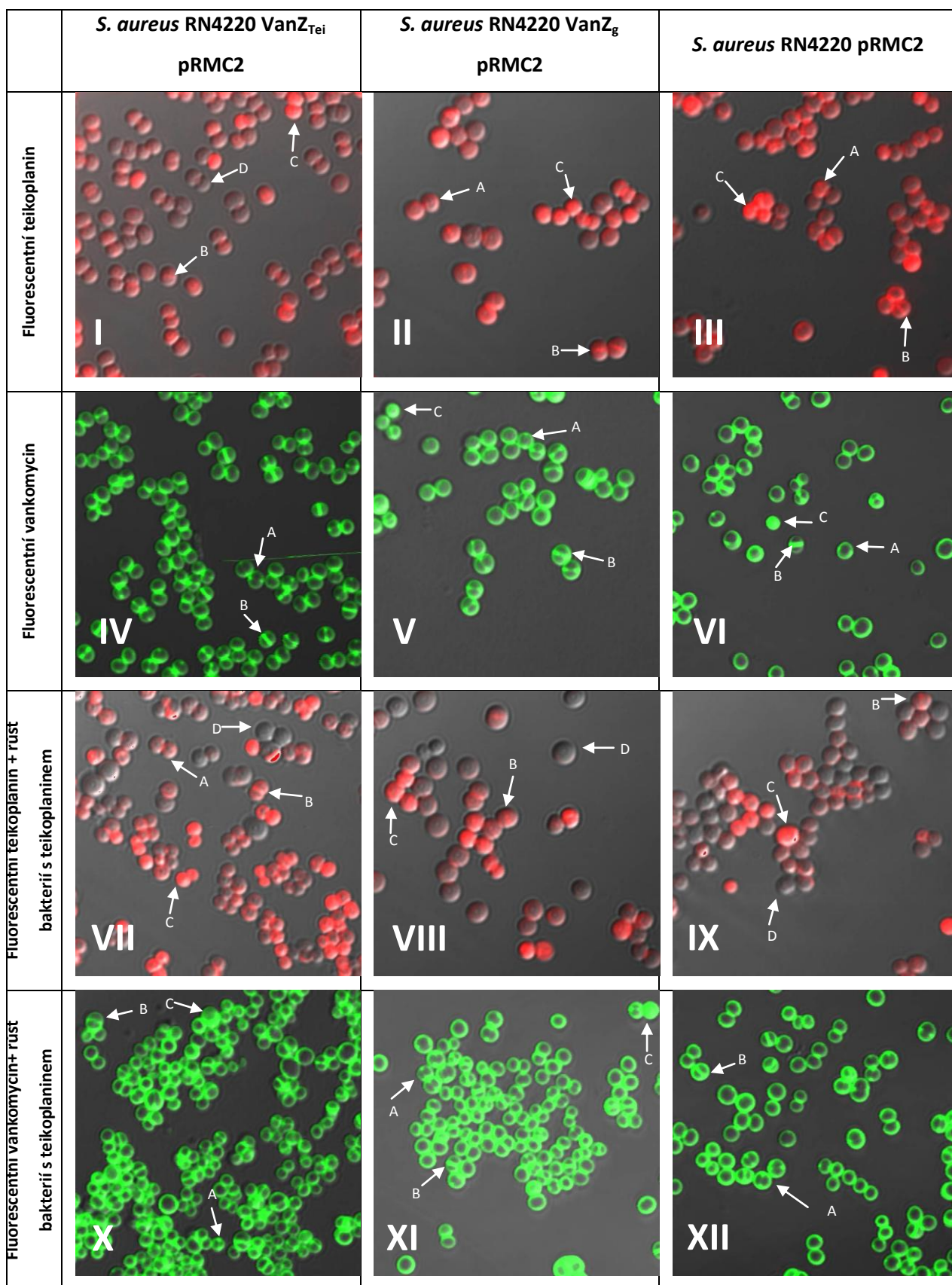
Buňky s ukončenou syntézou septa, (jev B), byly nejvíce zastoupeny v *S. aureus* RN4220 VanZ_{Tei} pRMC2 kultivovaného bez teikoplaninu. Frekvence jevu B se v ostatních preparátech výrazně nelišila.

Jevy C a D, které mohou být interpretovány jako průnik antibiotika do buňky a snížená vazba antibiotika na buňku, se téměř výhradně objevují u buněk značených FL-teikoplaninem (obr. 26 A a B). Proto v následujícím odstavci jsou popsány výsledky kvantifikace jevů C a D pouze u preparátů inkubovaných s FL-teikoplaninem (obr. 26 A).

Frekvence výskytu, buněk vyplněných fluorescenčním signálem (jev C) se mezi jednotlivými kmeny a ani v závislosti na inkubaci s teikoplaninem výrazně neliší (Obr. 26 A).

Naopak četnost výskytu buněk bez navázaného antibiotika (jev D) se v důsledku inkubace s teikoplaninem měnila. Zatímco u kmene s prázdným vektorem došlo vlivem teikoplaninu ke snížení frekvence buněk bez signálu u kmenů s geny vanZ tomu bylo naopak. Inkubace s teikoplaninem měla za následek zvýšení počtu buněk bez signálu, přičemž četnost tohoto jevu byla mnohem vyšší u buněk s geny vanZ v porovnání s kmenem obsahující prázdným vektorem.

Obrázek 24 Přehled vybraných snímků z konfokálního mikroskopování pro kmeny *S. aureus* RN4220 VanZ_{Tei} pRMC2, *S. aureus* RN4220 VanZ_g pRMC2 a *S. aureus* RN4220 pRMC2 označené FL-Tei a FL-Van (I-VI) a pro stejné kmeny označené také FL-Tei a FL-Van, ale kultivované v subinhibiční koncentraci teikoplaninu (VII-XII).



Vysvětlivky k obrázku 24 na předchozí straně:

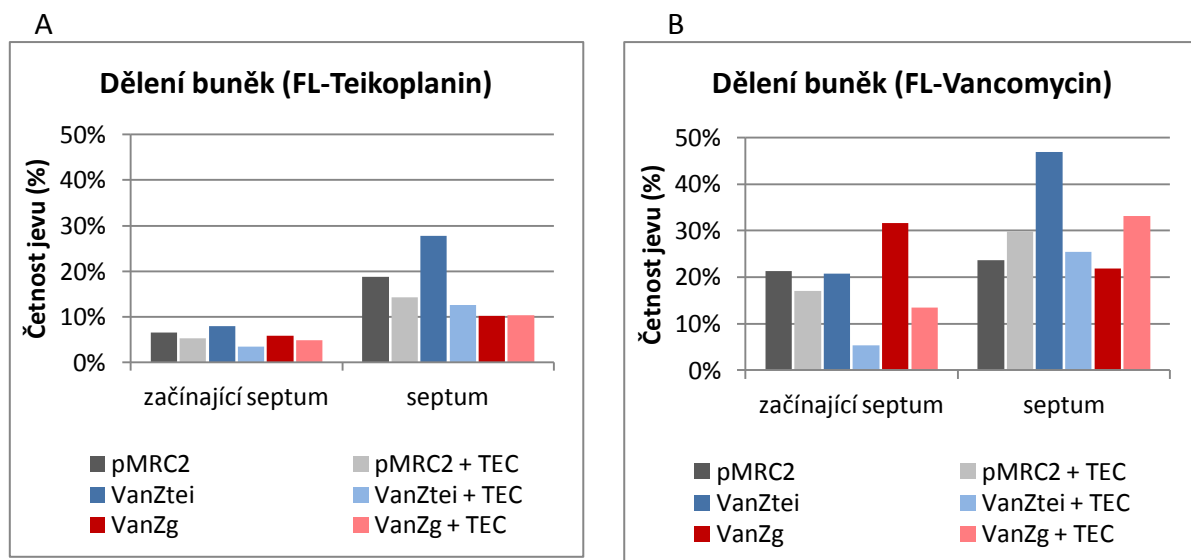
A = počátek dělení

B = ukončené dělení septem

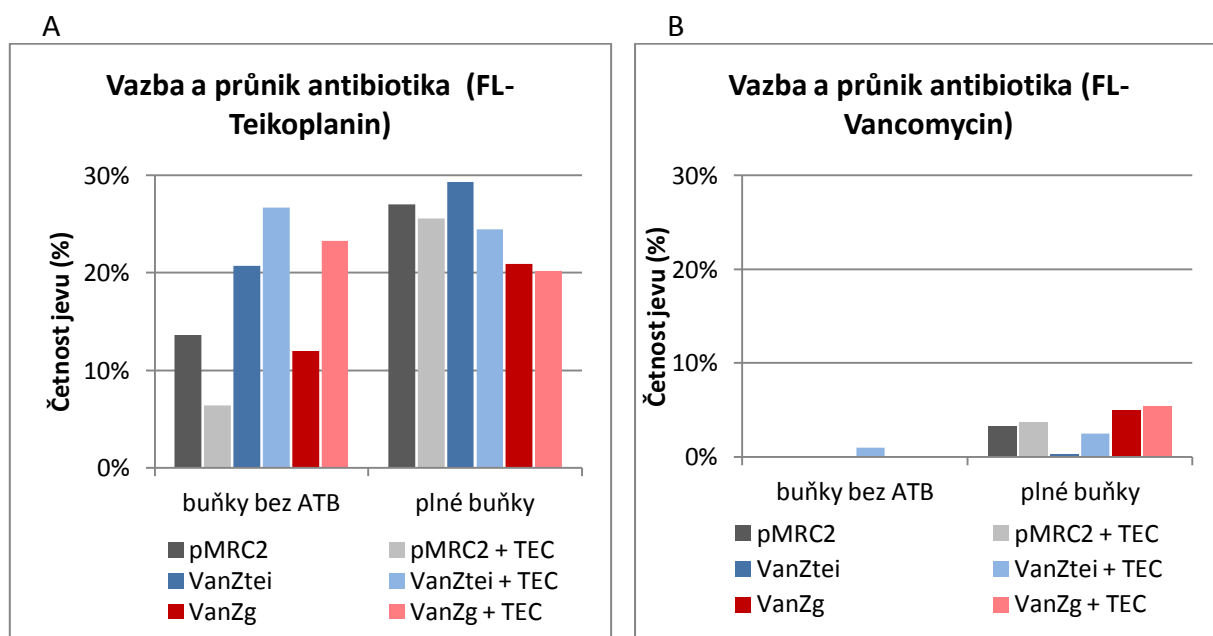
C = buňka plná antibiotika

D = buňka bez navázaného antibiotika

Obrázek 25 Grafy zobrazující četnost jevů týkající se dělení buněk, které byly pozorovatelné u mikroskopovaných preparátů. Jevy jsou viditelné díky FL-Tei (A) i FL-Van (B).



Obrázek 26 Grafy zobrazující četnost jevů týkající se vazby a průniku antibiotika, které byly pozorovatelné u mikroskopovaných preparátů. Jevy jsou viditelné díky FL-Tei (A) i FL-Van (B).



Popis grafů: Kmeny *S. aureus* RN4220 VanZ_{Tei} pMRC2 (zkratka VanZtei), *S. aureus* RN4220 VanZ_g pMRC2 (zkratka VanZg) a *S. aureus* RN4220 pMRC2 (zkratka pMRC2) byly kultivovány dvěma způsoby (bez přidání teikoplaninu a se subinhibiční koncentrací teikoplaninu). V grafu jsou kmeny kultivované se subinhibiční koncentrací teikoplaninu označeny přidanou zkratkou +TEC ke zkrácenému názvu kmene. Na ose x jsou zobrazeny jednotlivé jevy a výčet preparátů, osa y vyjadřuje procentuální četnost jevů.

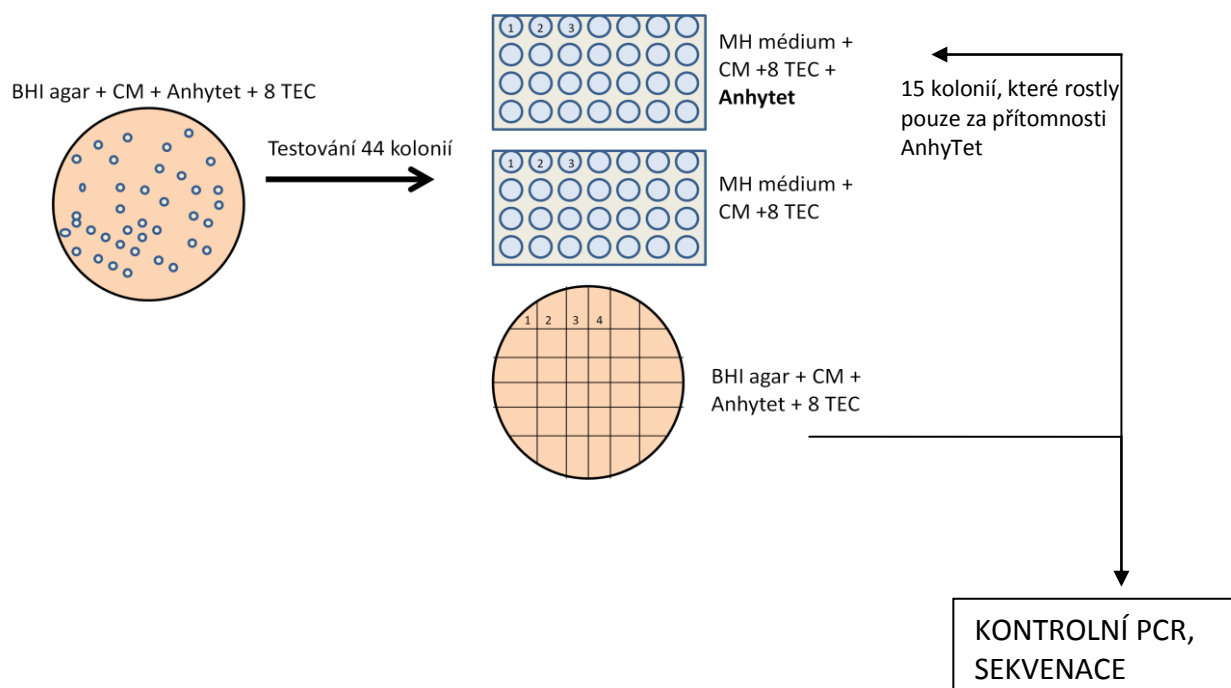
5.5 Selekce *S. aureus* RN4220 VanZ_{Tei} pRMC2 mutant rezistentních k teikoplaninu

Oproti očekávání bylo zjištěno, že na rozdíl od *Enterococcus faecalis*, ovlivňuje protein VanZ_{Tei} rezistenci k teikoplaninu u *S. aureus* jen velmi nepatrně (viz. kap. 5. 3 tabulka č. 5). Příčinou můžou být rozdíly v genetické výbavě *S. aureus* a *Enterococcus faecalis*. Z tohoto důvodu byl navržen experiment, kterým bylo možné vyselektovat mutanty původního kmene *S. aureus* VanZ_{Tei} pRMC2, které by vykazovaly zvýšenou rezistenci k teikoplaninu podmíněnou expresí vanZ_{Tei}. Jelikož u bakteriálních buněk můžou být zdrojem rezistence různé mutace, byla hledána mutace nejprve v genu *vanZ_{Tei}*, což by znamenalo přizpůsobení proteinu heterolognímu hostiteli. Pokud by v genu nebyla mutace nalezena, je možné, že se nachází v genomu hostitele, což umožňuje optimalizaci funkce proteinu. Identifikace takových mutací by mohla pomoci při porozumění mechanismu funkce těchto proteinů, v rámci mé diplomové práce byly selektovány rezistentní mutanty následujícím způsobem.

Po dvou hodinách inkubace jedné kolonie *S. aureus* VanZ_{Tei} pRMC2 v 10 ml BHI média s chloramfenikolem (10 µg/ml) ve 37°C (OD = 0,5) byly přidány induktor exprese VanZ_{Tei} (100 ng/ml anhydrotetracyklinu) a teikoplanin o koncentraci odpovídající polovině subinhibiční koncentrace (0,25 µg/ml). Kultura rostla 24 hodin a následně byla po 200 µl vyseta na misky obsahující BHI agar, chloramfenikol (10 µg/ml), anhydrotetracyklin (100 ng/ml) a různé koncentrace teikoplaninu ({0,5; 1; 2; 4; 8} µg/ml). Následující den byly misky vyhodnoceny. Na miskách s teikoplaninem v koncentracích 0,5 – 4 µg/ml byl pozorován souvislý bakteriální porost. Pouze na misce s nejvyšší koncentrací teikoplaninu 8 µg/ml byly rozlišitelné jednotlivé kolonie.

44 vybraných rezistentních kolonií, které vyrostly na BHI agaru s Tei 8 µg/ml bylo přeočkováno současně na misku s BHI agarem obsahující Tei 8 µg/ml, CM (10 mg/ml), AnhyTet (100 ng/ml) a také do dvou paralelních mikrotitračních destiček obsahující MH médium s Tei 8 µg/ml a CM (10 mg/ml). Přičemž v jedné byl přidán anhydrotetracyklin jako induktor a v druhé nikoliv. Cílem bylo vyselektovat pouze kolonie, které rostou v přítomnosti anhydrotetracyklinu, tedy kolonie, které jsou rezistentní pouze díky expresi *vanZ_{Tei}* (viz. obr. 27 schematické znázornění pokusu). Ze 44 kolonií se jednalo pouze o 15 kolonií (tabulka č. 7). Gen *vanZ_{Tei}* byl u těchto kolonií amplifikován pomocí kontrolní PCR s využitím primerů pRMC2 F a pRMC2 R (kap. 4. 2. 4). Stejné primery byly použity také pro sekvenaci PCR produktu (kap. 4. 2. 9). V tomto případě se jedná o amplifikaci úseku o délce 734 bp.

Obrázek 27 Schematické znázornění pokusu s analýzou rezistentních mutant exprimujících VanZ_{Tei}.



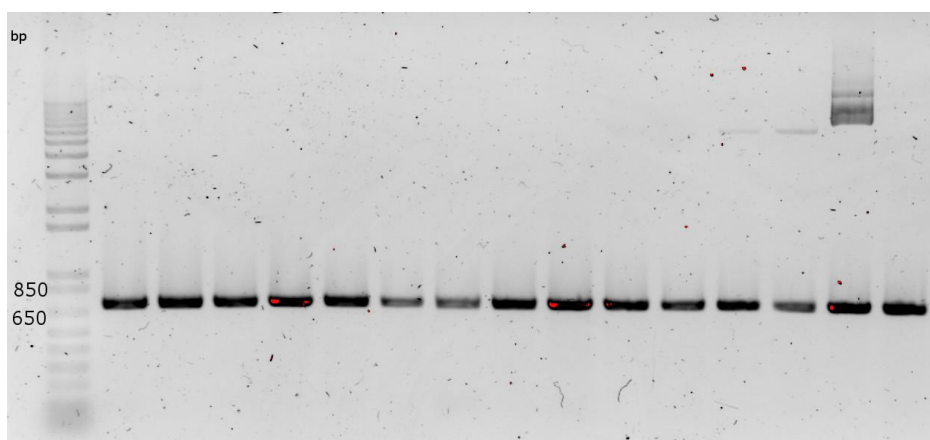
Ve všech 15 vzorcích byl zjištěn očekávaný fragment viz obr. č. 28 . Pomocí PROMEGA kitu byla přečištěna PCR směs a na sekvenaci byla poslána DNA ze všech 15 kolonií.

Gen *vanZ_{Tei}* byl osekvenován ve 14 vzorcích a u všech bez jediné změny. Tudíž ke vzniku rezistentních mutant nedošlo v důsledku mutace v genu *vanZ_{Tei}*. Dalšími experimenty bude nutné zjistit, zda se mutace nachází v genomu nebo v plasmidu pRMC2.

Tabulka 7 Výsledky testování rezistentních kolonií v závislosti na expresi *vanZ_{Tei}*.

Počet kolonií	8 TEI + AnhyTet	8 TEI	Interpretace výsledků
15	rostou	nerostou	Rezistence závislá na expresi <i>vanZ_{Tei}</i>
6	rostou	rostou	Mutace v genomu způsobující rezistenci, nebo mutace v indukibilním promotoru – konstitutivní exprese <i>vanZ_{Tei}</i> .
2	nerostou	rostou	Mutace v genomu způsobující rezistenci, která je ovšem v rozporu s expresí <i>vanZ_{Tei}</i> nebo v rozporu s přítomností AnhyTet.
21	nerostou	nerostou	Zvýšení rezistence nebylo potvrzeno

Obrázek 28 Ověření přítomnosti genu *vanZ_{Tei}* v rezistentních koloniích kontrolní PCR.



5.6 Testování aktivity fúzních proteinů *VanZ_{Tei} his tag* a *VanZ_g his tag*

K imunodetekci lokalizace membránových proteinů *VanZ_{Tei}* a *VanZ_g* byly připraveny konstrukty exprimující fúzní proteiny *VanZ_{Tei} his tag* a *VanZ_g his tag*, obsahující na C konci 6 histidinů.

U fúzních proteinů bylo nutné ověřit, že se nezměnila jejich funkce a jsou tedy vhodné ke stanovení membránové topologie. Pro ověření bylo použito porovnání rezistenčního fenotypu udíleného fúzními proteiny s fenotypem jejich původních forem. Byla stanovena minimální inhibiční koncentrace (MIC) pro teikoplanin a vankomycin v přítomnosti

anhydrotetracyklinu (100 ng/ml) pro všechny připravené transformované kmeny *S. aureus* RN4220. Hodnoty MIC pro teikoplanin byly u kmenů exprimujících fúzané proteiny totožné s kmenem nesoucím pouze prázdný plazmid (0,5 µg/ml) a hodnoty MIC pro vankomycin byly dokonce nižší (0,5 µg/ml pro kmeny s fúzními proteiny; 1 µg/ml pro *S. a.* RN4220 pRMC2). To naznačuje, že exprese fúzních proteinů může mít negativní účinek na růst buněk. Proto byl v další fázi testován vliv různých koncentrací anhydrotetracyklinu, tj. vliv různých úrovní exprese genů na úroveň rezistence (tabulky č. 8 a 9) a na růst.

Tabulka 8: Testování citlivosti k teikoplaninu v různých koncentracích anhydrotetracyklinu.

Koncentrace AnhyTet (ng/ml)	MIC pro teikoplanin (µg/ml)				
	0	10	50	100	200
Kmen <i>S. a.</i> RN4220 VanZ _{Tei} pRMC2	1	1	-	1	1
Kmen <i>S. a.</i> RN4220 VanZ _{Tei} his tag pRMC2	1	1	-	0,5	0,5-1
Kmen <i>S. a.</i> RN4220VanZ _g pRMC2	2	4	2	4-8	4
Kmen <i>S. a.</i> RN4220 VanZ _g his tag pRMC2	1	2	2	0,5	0,5
Kmen <i>S. a.</i> RN4220pRMC2	1	1	1	0,5	0,5

Tabulka 9: Testování citlivosti k vankomycinu v různých koncentracích induktoru.

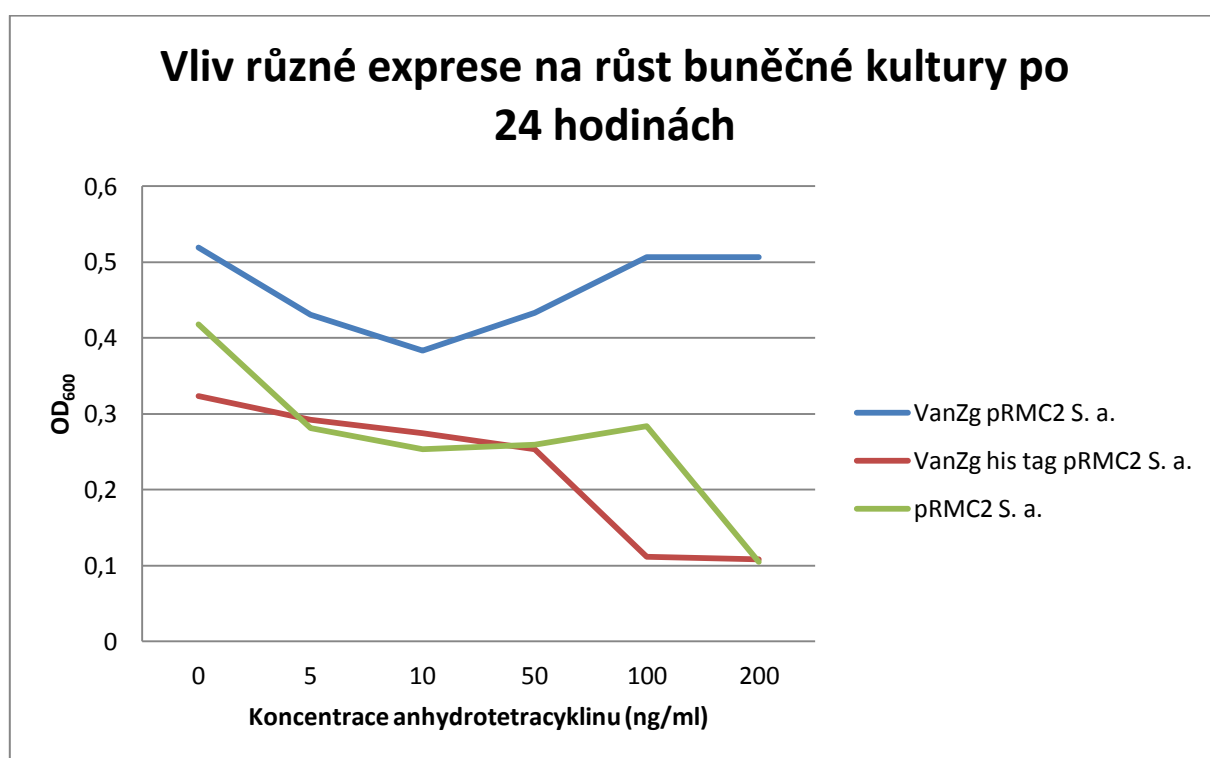
Koncentrace AnhyTet (ng/ml)	MIC pro vankomycin (µg/ml)				
	0	10	50	100	200
Kmen VanZ _{Tei} pRMC2 <i>S. a.</i> RN4220	1	1	-	1	1
Kmen VanZ _{Tei} his tag pRMC2 <i>S. a.</i> RN4220	1	1	-	0,5	0,5-1
Kmen VanZ _g pRMC2 <i>S. a.</i> RN4220	1	1	1	1	1
Kmen VanZ _g his tag pRMC2 <i>S. a.</i> RN4220	1	1	1	0,5	0,5-1
Kmen pRMC2 <i>S. a.</i> RN4220	1	1	1	1	1

Z tabulek č. 9 a 10 je patrné, že citlivost k oběma antibiotikům u kmenů exprimujících fúzní proteiny VanZ_{Tei}his tag a VanZ_ghis tag je skutečně negativně ovlivněna vyššími koncentracemi AnhyTet (≥ 100 ng/µl). Nicméně při nižších koncentracích induktoru (10 a 50 ng/ml je protein VanZ_ghis tag částečně aktivní, tj. snižuje dvakrát citlivost k teikoplaninu.

Naopak VanZ_{Tei}his tag neovlivňuje citlivost k teikoplaninu ani při jedné z testovaných koncentrací AnhyTet. Hodnoty MIC pro vankomycin se u kmenů téměř neliší, ale při vyšší koncentraci AnhyTet (≥ 100 ng/ μ l), lze i zde vidět pokles MIC pro vankomycin u kmenů s histidinovou kotvou.

U kmene *S. aureus* VanZ_g his tag pRMC2 byl sledován růst buněčné kultury za různých indukčních podmínek. Konkrétně byly testovány následující koncentrace AnhyTet 0, 5, 10, 50, 100 a 200 ng/ml. V tomto případě kultivace probíhala bez přítomnosti glykopeptidových antibiotik. Hodnoty optické density byly odečítány po 2, 6 a 24 hodinách inkubace ve 37°C.

Obrázek 29 Vliv různé míry exprese genů *vanZ_g* a *vanZ_g his tag* na růst buněčné kultury.



Popis grafu: Na ose x jsou vyneseny testované koncentrace induktoru exprese (anhydrotetracyklinu). Na ose y jsou zaznamenány hodnoty optické density, které byly zaznamenány po 24 hodinovém růstu kmenů *S. aureus* RN4220 VanZ_g pRMC, *S. aureus* RN4220 VanZ_g his tag pRMC2 a kontrolní kmen *S. aureus* RN4220 pRMC2.

Z grafu (obr. 29), který zobrazuje konečný nárůst biomasy po 24 hodinách kultivace v závislosti na přítomnosti AnhyTet, vyplývá, že AnhyTet má negativní vliv na růst buněk jak u kmene *S. aureus* RN4220 VanZ_ghis tag pRMC2, tak i u kontrolního kmene *S. aureus* RN4220 pRMC2. Naopak růst kmene *S. aureus* RN4220 VanZ_g pRMC2 je přítomností AnhyTet ovlivněn minimálně.

Z výsledků lze usuzovat, že histidinová kotva pravděpodobně ovlivňuje funkci proteinu. Taky je patrné, že funkce proteinu VanZ_g kompenzuje inhibiční vliv vyšší koncentrace AnhyTet na růst buňky.

6 Diskuze

Odolnost neboli rezistence bakterií vůči antimikrobiálním látkám je často vlastností získanou. Tento proces nabytí bývá poměrně rychlý zvláště v případě působení selekčního tlaku. Již krátce po zavedení nových antibiotik do klinické praxe se objevují rezistentní kmeny s novými ochrannými mechanismy před účinky těchto látek. Vysoký výskyt a rychlá selekce nových rezistencí vůči antibiotikům je celosvětovým problémem a může to být jednou z hrozeb pro lidstvo především u nozokomiálních infekcí. Glykopeptidová antibiotika se dlouhodobě vyjímalas svou účinností i proti různým rezistentním kmenům a to díky svému specifickému mechanismu účinku, který je zaměřen na prekursor biosyntézy buněčné stěny. Díky přizpůsobivosti bakterií se však i ke glykopeptidovým antibiotikům brzy vyvinula rezistence. Navíc frekvence enterokokových a stafylokokových kmenů rezistentních ke glykopeptidům stoupá. Detailní pochopení mechanismů rezistence ke glykopeptidovým antibiotikům, je jedním z vyšších cílů, jak efektivně navrhnout nová dlouhodobě účinná antibiotika.

Náplní mé diplomové práce bylo studium mechanismu rezistence k teikoplaninu, udílené genem *vanZ* (*vanZ_{Tei}*) z rezistenčního genového kladru *vanRSHAXYZ*. Již dříve bylo publikováno, že *VanZ_{Tei}* udílí rezistenci k teikoplaninu u *Enterococcus faecalis* JH2-2 a to nezávisle na přítomnosti ostatních genů kladru (Arthur et al, 1995). *VanZ_{Tei}* je jediným blíže studovaným členem velké superrodiny *VanZ* proteinů. Aby bylo možné zjistit, nakolik je rezistentní funkce *VanZ_{Tei}* společná i pro ostatní proteiny *VanZ* superrodiny byl vybrán ortologní gen *vanZ_g*, jenž se nachází v genomu *Enterococcus faecium*. Hlavním cílem mé diplomové práce bylo porovnat vliv těchto dvou ortologních proteinů na rezistenci ke glykopeptidovým antibiotikům a přispět tak k objasnění mechanismu rezistence udílené genem *vanZ_{Tei}*.

Překvapivým poznatkem v této diplomové práci je to, že *vanZ_{Tei}* z rezistenčního genového kladru minimálně snižuje citlivost k teikoplaninu u kmene *Staphylococcus aureus* RN4220 (dvojnásobné snížení citlivosti v porovnání s kmenem s prázdným vektorem) a naopak *VanZ_g* je v udílení rezistence k teikoplaninu mnohem účinnější ($MIC_{Tei} = 4 - 8 \mu g/ml$). Hodnoty pro *vanZ_g* jsou podobné hodnotám MIC pro *VanZ_{Tei}* v práci Arthura a jeho kolegů (1995), kteří udávají, že minimální inhibiční koncentrace pro teikoplanin u kmene *Enterococcus faecalis* JH2-2 exprimující *VanZ_{Tei}* je $8 \mu g/ml$ (Arthur et al, 1995). O funkci *VanZ_g* který má 42% sekvenční identitu s *VanZ_{Tei}* nebylo dosud nic známo a toto je první informace o jeho funkci jako rezistenční protein. Co se týče nízké účinnosti *VanZ_{Tei}* v udílení rezistence k teikoplaninu u *S. aureus*, lze předpokládat, že je způsobena genetickou

rozdílností stafylokoků a enterokoků. Pro úplné porovnání vlivu obou proteinů na rezistenci v heterologních hostitelích bude nutné oba proteiny exprimovat v *Enterococcus faecalis* a *faecium*. Ačkoli to bylo jedním z cílů této diplomové práce, tento cíl se nepodařilo uskutečnit. Důvodem byl nevhodně zvolený expresní vektor, nekompatibilní s *Enterococcus faecium*. V budoucnu použijeme jiný expresní vektor vhodný pro expresi genů v *E. faecium*.

Hlavním důvodem použití kmene *Staphylococcus aureus* jako hostitele pro stanovení vlivu proteinů VanZ na rezistenci ke glykopeptidům byla skutečnost, že nekóduje na rozdíl od *E. faecium* žádný VanZ protein ve svém genomu což by mohlo komplikovat pozorování fenotypu. Navíc máme v naší laboratoři již zavedené metody pro genetickou manipulaci s *S. aureus* a také zkušenosti se studiem mechanismů rezistence u tohoto druhu. Kromě toho *Staphylococcus aureus* je nejčastěji nalézaným lidským patogenem, zejména v nemocničním prostředí kde dochází vlivem velkého selekčního tlaku k akumulaci rezistencí. Zvláště nozokomiální infekce způsobené kmeny methicilin-rezistentními *S. aureus* (MRSA) nebo vzácně kmeny vankomycin-rezistentními *S. aureus* (VRSA) jsou problematické pro léčbu. Výskyt VRSA kmenů je zvláště nebezpečný, jelikož glykopeptidy jsou používány jako antibiotika poslední volby proti MRSA. VRSA získal svoji rezistenci konjugativním přenosem genů z *vanA* rezistenčního genového klastru pocházející z enterokoků. První VRSA byly zaznamenány v roce 2002 v USA (Chang et al, 2003) a od té doby se objevilo jen několik dalších VRSA kmenů. Selekční tlak, který je vyvíjen na bakteriální buňku, je nakonec tím činitelem, kvůli němuž si bakterie neustále vyvíjí nové mechanismy úniku před vlivem antibiotik. V této souvislosti je důležité definovat vliv VanZ proteinů na rezistenci či citlivost k teikoplaninu u *Staphylococcus aureus*, jelikož, jak vyplývá z této diplomové práce, rezistenční funkce VanZ proteinů je v *S. aureus* zachována. Existuje tedy vysoká pravděpodobnost přenosu VanZ z enterokoků do stafylokoků.

Jednou z možných příčin, že se VanZ_{Tei} neprojevuje stejnou měrou jako u *Enterococcus faecalis* může být i fakt, že pro expresi proteinu bylo použito původní ribozomální vazebné místo (RBS), které nemusí být dobře rozpoznáváno ribozomy *S. aureus*. Kromě toho, jsou RBS pro VanZ_{Tei} a VanZ_g odlišná a tudíž se může lišit i míra produkce těchto proteinů ve *Staphylococcus aureus*. Je tedy možné, že VanZ_g je syntetizován velmi dobře a VanZ_{Tei} nikoliv.

Ani VanZ_{Tei} a VanZ_g neudílají rezistenci k vankomycinu, což je v souladu se studií (Arthur et al, 1995). Jedním z dalších testovaných glykopeptidových antibiotik byl dalbavancin (lipoglykopeptid), jenž byl do klinické praxe zaveden teprve nedávno. Začal se používat v květnu 2014 v USA a to proti kmenům MRSA a *Streptococcus pyogenes*, které

způsobují vážná kožní onemocnění. Dosud nebyl zaznamenán izolát, který by vykazoval rezistenci k dalbavancinu vyjma kmenů obsahující *vanA* rezistenční klastr.. Minimální inhibiční koncentrace dalbavancinu pro 90% bakteriálních kmenů (methicilin - citlivý *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus anginosus*, *Enterococcus faecium*, *Enterococcus faecalis*) byla stanovena na 0,13 µg/ml. Ale pro kmeny *Enterococcus spp.* s *vanA* rezistenčním klastrem není dalbavancin plně účinný (0,5 - > 128 µg/ml), s *vanB* rezistenčním klastrem dosahuje MIC hodnot 0,02-2 µg/ml (Candiani et al., 1999).

Expresí genu *vanZ_g* udílela sníženou citlivost k dalbavancinu. Minimální inhibiční koncentrace dalbavancinu pro tento kmen dosahovala 1 µg/ml, což je osmi násobné snížení citlivosti. U kmene exprimující *VanZ_{Tei}* se citlivost snížila v porovnání s kontrolním kmenem pouze dvakrát (MIC = 0,25 µg/ml). Tyto výsledky potvrzují skutečnost, že existuje jiný mechanismus rezistence k dalbavancinu než ten, co je dán pouze přítomností *vanA* rezistenčního klastru a je jen otázkou času než se objeví první klinické kmeny rezistentní k dalbavancinu. Dalbavancin se strukturně více podobá teikoplaninu než vankomycinu zejména proto, že obsahuje stejně jako teikoplanin dlouhý řetězec mastné kyseliny. Od teikoplaninu se také liší přemístěním acylglukozaminu z benzylové pozice. Odlišný způsob působení na molekulární úrovni, způsobený především přítomností lipidového zbytku, který se zasouvá do membrány a neschopností vytvářet diméry, může být jedním z důvodů, proč zaznamenáváme sníženou citlivost kmenů k těmto dvěma antibiotikům.

Dalšími testovanými glykopeptidovými antibiotiky byly nově syntetizovaná antibiotika, které jsme získali z Vědecké univerzity Lájose Kossutha v Debrecínu. Struktury těchto nových látek nebyli prozatím publikovány, naše laboratoř se podílí na charakterizaci těchto látek s ohledem na spektrum a mechanismus účinku. Na rozdíl od předchozích testovaných glykopeptidových antibiotik, u nově syntetizovaných antibiotik exprese proteinu *VanZ_{Tei}* ovlivňuje citlivost k těmto látkám účinněji (čtyřnásobné zvýšení rezistence u MA79, SKA30 a ERJ390) než *VanZ_g* (2-4 násobné zvýšení rezistence u SKA30 a ERJ390 a dvojnásobné zvýšení u MA79). Tyto výsledky potvrdily, že *VanZ_{Tei}* je v *S. aureus* funkční a poukazují na jeho odlišnou specifitu. Také vyvracejí domněnku o rozličné síle exprese těchto dvou genů. v důsledku rozdílných RBS. Zdá se, že společným jmenovatelem glykopeptidů rozpoznávaných proteiny *VanZ* je přítomnost lipidového řetězce, který je v případě nově syntetizovaných glykopeptidů na odlišném místě než u teikoplaninu (obr. 5) a dalbavancinu (obr. 7).

Testování citlivosti k antibiotikům (kontrolní skupina antibiotik) s odlišným mechanismem působení než je u glykopeptidových antibiotik potvrzuje, že VanZ_{Tei} a VanZ_g jsou specifické pouze vůči glykopeptidům. A nezasahují do účinků drah ostatních antibiotik.

Ačkoliv kmeny *S. aureus* RN4220 VanZ_{Tei} pRMC2 ovlivňují citlivost k teikoplaninu pouze minimálně, byly snadno vyselektovány mutanty rezistentní k vyšším koncentracím teikoplaninu. Žádná mutace v genu VanZ_{Tei} ani jeho ribozomálním vazebném místě nebyla nalezena, lze tedy předpokládat, že za zvýšení rezistence jsou zodpovědné mutace buď v nekódující části plazmidu vanZ_{Tei} pRMC2 nebo v genomu *S. aureus*. Pro vyloučení účinku mutací na plazmidové DNA ke vzniku rezistence k teikoplaninu budou nutné další experimenty. Bude zapotřebí kultivačními podmínkami odléčit plazmid z *S. aureus* VanZ_{Tei} pRMC2 vykazující vysokou rezistenci (Smith & Bidochka, 1998). Do takto nově připravených kmenů *S. aureus* budou elektroporací transformovány připravené konstrukty vanZ_{Tei} pRMC2 a vanZ_g pRMC2. Pokud jsou mutace v genomu tak by se výsledky z měření citlivosti k různým antibiotikům u kmene s nově transformovaným plazmidem měli shodovat s hodnotami původní mutanty a zároveň mutanta s odléčeným plazmidem by měla být citlivá. Pokud tomu tak je, může být následně mutace vyhledána osekvenováním celého genomu. Jelikož by mutace měla vést k vylepšení funkce proteinu VanZ (možné ovlivnění regulace exprese, ovlivnění stresové odpovědi), identifikace mutace by mohla pomoci s určením mechanismu funkce proteinu VanZ. Obzvláště pokud by se mutace nacházela ve známé oblasti genomu.

Protein VanJ, který se nachází ve *Streptomyces coelicolor* kódovaný genem z genového klastru vanRSJKHAX, udílí rezistenci k teikoplaninu a jeho derivátům nikoliv k vankomycinu a jeho derivátům a to bez účasti dalších proteinů kódovaných genovým klastrem (kap. 3. 2. 1. 1. 2) (Novotná et al., 2012). Tyto výsledky jsou podobné s měřením citlivosti kmenů s VanZ_g k teikoplaninu a dalbavancinu. Dalbavancin je derivátem teikoplaninu a obsahuje shodnou heptapeptidovou kostru. Proti vankomycinu a kontrolním antibiotikům ze skupiny inhibitorů buněčné stěny není VanZ_g účinný podobně jako VanJ.

Ačkoliv vankomycin a teikoplanin jsou velmi podobná antibiotika, zdá se být pravděpodobné, že místo a míra vazby na buňku je odlišná u buněk rezistentních a těch, co vykazují citlivost k těmto antibiotikům.

V rámci této diplomové práce byla provedena první „pilotní“ mikroskopická pozorování rozdílů ve vazbě fluorescenčně značených glykopeptidů, FL-teikoplaninu a FL-vankomycinu na buněčnou stěnu *S. aureus* RN4220 exprimující VanZ_{Tei} a VanZ_g. Vzájemně byly porovnávány kmeny *S.a.* VanZ_{Tei} pRMC2, *S.a.* VanZ_g pRMC2 a *S.a.* pRMC2 lišící se

svojí schopností udílet rezistenci k teikoplaninu. Buňky byly pro účely pozorování kultivovány bez a za přítomnosti subinhibiční koncentrace teikoplaninu.

Již ze zběžného pohledu na mikroskopické snímky, lze zaznamenat několik jevů, jejichž četnost byla v rámci diplomové práce kvantifikována. Pro přesnou interpretaci výsledků vyplývajících z mikroskopických pozorování bude nutné provést pozorování několika nezávislých kultur (biologická opakování) a data následně statisticky zpracovat, aby došlo k minimalizaci vlivů nesouvisejících přímo s expresí genů *vanZ*. Jednou z nich jsou možné odchylky při kultivaci buněk pro přípravu preparátů a to i přesto, že byla snaha buňky odebírat při stejné optické densitě ($OD_{600} = 0,2$). Další proměnnou, která může mít vliv je fakt, že buňky byly před mikroskopováním zamrazeny (jelikož se mikroskop nenachází v místě laboratoře a vzorky musely být převáženy). To může mít na buněčné kultury různý dopad. Kromě toho samotné mikroskopování může ovlivnit interpretaci výsledků, ačkoliv z každého preparátu bylo uděláno pět snímků, nemůžeme si být jisti náhodou výběru místa focení (člověk podvědomě vybírá místa, která se mu líbí). A poslední zmíněnou proměnnou je samotné počítání jevů, které vyhodnocuje člověk a je jen na jeho úsudku, který jev zaznamená a který ne. Například určení, které buňky, jsou na počátku dělení, a které už ne je obtížné a to zejména při horší kvalitě snímku. Přesto bylo na základě tohoto „pilotního“ experimentu vyvozeno několik závěrů.

Buňky, které neváží antibiotikum byly téměř výhradně pozorovány v případě značení FL-teikoplaninem. Tento jev může být projevem lyze buněk. Teikoplanin interaguje současně s peptidoglykanem a s buněčnou membránou. Předpokládá se, že interakce teikoplaninu s membránou umocňuje sílu vazby na prekurzory peptidoglykanu (Barna et al., 1984). Je možné, že u zlyzovaných buněk nedochází v případě teikoplaninu k vazbě na peptidoglykan právě z těchto důvodů. Tato studie je první, která používá fluorescenčně značený teikoplanin pro pozorování buněk, takže dříve nebylo možné tuto hypotézu testovat. Druhou možností je, že teikoplanin se na buňku neváže v důsledku změny ve složení buněčné membrány, která má za následek snížení schopnosti teikoplaninu s membránou interagovat. Pokud tomu tak je, snížená schopnost vázat FL-teikoplanin by měla být častější u buněk rezistentních k teikoplaninu. A skutečně, prázdné buňky byly častěji pozorovány u kmenů exprimujících *vanZ* geny, přičemž v přítomnosti teikoplaninu v kultivačním mediu se četnost ještě zvýšila.

Také buňky zdánlivě plné antibiotika byly pozorovány výhradně při značení FL-teikoplaninem. Také v tomto případě lze uvažovat o tom, že by tyto buňky mohli být zlyzované. Tomu nasvědčuje i fakt, že nejméně těchto plných buněk je pozorováno u kmene s genem *vanZg*, který je vůči teikoplaninu nejodolnější. Avšak, je třeba zdůraznit, že se

výrazně nelišil počet těchto buněk v závislosti na inkubaci s teikoplaninem. Což ale může být proto, že byla používána pouze subinhibiční koncentrace. Variantou tohoto experimentu by mohlo být to, že by byl ke kultuře přidán vankomycin ke konci kultivace a to v koncentracích inhibičních. Pak by efekt působení teikoplaninu na buňku a tudíž i efekt působení rezistence udílené VanZ_g byl mnohem zřetelnější. K odlišení zlyzovaných buněk od živých bude v budoucích experimentech použit komerční kit na Live/Dead barvení (LIVE/DEAD® Cell Imaging Kit, Life Technologies).

Zvláště pro interpretaci četnosti jevů spojených s dělením buněk bude nutné několik biologických opakování a následné statistické vyhodnocení. Nicméně z mikroskopování je patrné, že pro značení dělicích se buněk je vhodnější FL-Van, který se dobře váže na nově vznikající a i dokončené septum. Což potvrzuje předpoklad, že vankomycin se váže na nezpolymerizované peptidoglykanové prekurzory, které jsou přítomny ve větším množství zejména v místě aktivní syntézy peptidoglykanu. Hlavním místem syntézy buněčné stěny je pak špička dělicího septa, kam musí vankomycin difundovat. Jak dobře bude vankomycin difundovat do špičky vznikajícího septa je závislé na fázi buněčného cyklu, ve které se buňka nachází (Pereira et al., 2007).

Součástí experimentální práce byla příprava fúzních proteinů s histidinovou kotvou na C konci proteinu, jež by umožnila pomocí imunodetekce určit topologii proteinů v membráně. Funkčnost proteinů byla ověřena při testování citlivosti k antibiotikům a porovnáním s kmeny, které obsahují stejné proteiny bez histidinové kotvy. Výsledky ukazují, že protein VanZ_g his tag je pravděpodobně funkční, ale při jeho vyšší expresi má negativní účinek na buňku. VanZ_{Tei} his tag pravděpodobně funkční není. Z tohoto důvodu nebylo možné tyto proteiny použít k dalším experimentům. To, že histidinová kotva na C-konci negativně ovlivnila funkci proteinu, může naznačovat, že C-konec má zásadní úlohu pro správnou funkci proteinu. S tím souvisí i analýza vlivu aminokyselinových mutací na funkci proteinu programem SNAP2, jež identifikovala pro funkci důležité zbytky na C-konci a to především u proteinu VanZ_{Tei}. Mimo to, skutečnost, že proteiny VanZ jsou membránové proteiny s pěti transmembránovými helixy po celé délce proteinu, může fúze s histidinovou kotvou ovlivňovat i pozici transmembránových domén v membráně a tím i funkci proteinu. Řešením může být příprava fúzních proteinů s histidinovou kotvou na N konci nebo příprava specifických anti-VanZ protilátek.

Negativní efekt přítomnosti vyšších koncentrací anhydrotetracyklinu na růst buněk byl pozorován u kmene s VanZ_{Tei} his tag proteinem, ale i u kmene s prázdným plazmidem. To že ke stejné inhibici růstu nedochází u kmene s VanZ_g může být tím, že tento protein

kompenzuje negativní vliv anhydrotetracyklinu na buňku. V budoucnu bude zajímavé testovat citlivost kmenů exprimujících oba VanZ proteiny k tetracyklinu.

Tato diplomová práce je prvním vhladem, který může později vést k objasnění mechanismu rezistence ke glykopeptidům udílené proteiny VanZ a v širší souvislosti také k charakterizaci funkce celé VanZ superrodiny. To následně může přispět k vývoji nových antimikrobiálních látek, které budou mnohem účinnější a nebudou obsahovat např. rizikové skupiny, ke kterým si bakterie často vyvíjí nějakou podobu odolnosti.

7 Souhrn

1. V rámci této diplomové práce byly vytvořeny kmeny *Staphylococcus aureus* RN4220 kontrolovatelně exprimující dva ortologní proteiny VanZ_{Tei} (z rezistenčního klastru) a VanZ_g (z genomické DNA *Enterococcus faecium*). Nepodařilo se však vložit stejné konstrukty do *Enterococcus faecium* E1162, z důvodu nekompatibility zvoleného vektoru s recipientem.
2. VanZ_{Tei} a VanZ_g jsou proteiny s téměř neznámou funkcí a pomocí stanovení rezistenčního fenotypu byla umožněna jejich charakteristika.
 - a. Exprese VanZ_g u *Staphylococcus aureus* RN4220 udílí rezistence k teikoplaninu a dalbavancinu.
 - b. Exprese VanZ_{Tei} u *Staphylococcus aureus* RN4220 snižuje citlivost k teikoplaninu i dalbavancinu, ale jeho aktivita k udílení rezistence k teikoplaninu a dalbavancinu je mnohem nižší než aktivita VanZ_g (zvláště patrné u MIC teikoplaninu)
 - c. Exprese VanZ_{Tei} u *Staphylococcus aureus* RN4220 udílí rezistenci k nově syntetizovaným antibiotikům. U kmene s VanZ_g také dochází k snížení citlivosti vůči těmto antibiotikům, přesto je, ale vůči těmto antibiotikům, aktivnější VanZ_{Tei}.
 - d. Exprese VanZ_g ani VanZ_{Tei} u *Staphylococcus aureus* RN4220 neovlivňuje vznik rezistence či snížení citlivosti k vankomycinu a dalším neglykopeptidovým antibiotikům.
3. Mikroskopické snímky z konfokálního mikroskopu poprvé naznačují možnou preferenci míst působení či vazby fluorescenčního vankomycinu (především septum) a fluorescenčního teikoplaninu (povrch membrány). K přesné interpretaci výsledků bude nutné udělat několik opakování experimentu a statistické vyhodnocení.
4. Podařilo se vyselektovat mutanty *S. aureus* RN4220 VanZ_{Tei} pRMC2 se zvýšenou rezistencí k teikoplaninu (MIC_{Tei} >8 µg/ml) u nichž je rezistence závislá na expresi VanZ_{Tei}. Tyto rezistentní mutanty nenesou mutaci v genu *vanZ_{Tei}* ani v jeho ribozomálním vazebném místě.
5. Pro detekci a určení membránové topologie byly připraveny fúzní proteiny VanZ_{Tei} *his tag* a VanZ_g *his tag*, které obsahovaly šest histidinů na svém C konci. Z výsledků vyplývá, že při vyšší expresi genů kódujících fúzní proteiny dochází k negativnímu účinku na buňky a to i v nepřítomnosti teikoplaninu či vankomycinu. Z růstové křivky při použití různých koncentrací anhydrotetracyklinu lze také vyvozovat domněnku o

negativním vlivu anhydrotetracyklinu na buňku, jenž by mohl být kompenzován syntézou VanZ proteinu.

8 Seznam použité literatury

- Arthur, M., and P. Courvalin, 1993, Genetics and mechanisms of glycopeptide resistance in enterococci: *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 37, p. 1563-1571.
- Arthur, M., F. Depardieu, L. Cabanie, P. Reynolds, and P. Courvalin, 1998, Requirement of the VanY and VanX D,D-peptidases for glycopeptide resistance in enterococci: *Molecular Microbiology*, v. 30, p. 819-830.
- Arthur, M., F. Depardieu, and P. Courvalin, 1999, Regulated interactions between partner and non-partner sensors and response regulators that control glycopeptide resistance gene expression in enterococci: *Microbiology-Uk*, v. 145, p. 1849-1858.
- Arthur, M., F. Depardieu, G. Gerbaud, M. Galimand, R. Leclercq, and P. Courvalin, 1997, The VanS sensor negatively controls VanR-mediated transcriptional activation of glycopeptide resistance genes of Tn1546 and related elements in the absence of induction: *Journal of Bacteriology*, v. 179, p. 97-106.
- Arthur, M., F. Depardieu, C. Molinas, P. Reynolds, and P. Courvalin, 1995, The *vanZ* gene of tn1546 from *Enterococcus-faecium* BM4147 confers resistance to teicoplanin: *Gene*, v. 154, p. 87-92.
- Arthur, M., F. Depardieu, P. Reynolds, and P. Courvalin, 1999, Moderate-level resistance to glycopeptide LY333328 mediated by genes of the *vanA* and *vanB* clusters in enterococci: *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 43, p. 1875-1880.
- Arthur, M., F. Depardieu, H. A. Snaith, P. E. Reynolds, and P. Courvalin, 1994, Contribution of VanY d,d-carboxypeptidase to glycopeptide resistance in *Enterococcus-faecalis* by hydrolysis of peptidoglycan precursors: *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 38, p. 1899-1903.
- Arthur, M., C. Molinas, and P. Courvalin, 1992, The VanS-VanR 2-component regulatory system controls synthesis of depsipeptide peptidoglycan precursors in *Enterococcus-faecium* bm4147: *Journal of Bacteriology*, v. 174, p. 2582-2591.
- Arthur, M., C. Molinas, F. Depardieu, and P. Courvalin, 1993, Characterization of Tn1546, a Tn3-related transposon conferring glycopeptide resistance by synthesis of depsipeptide peptidoglycan precursors in *Enterococcus-faecium* BM4147: *Journal of Bacteriology*, v. 175, p. 117-127.
- Arthur, M., and R. Quintiliani, 2001, Regulation of VanA- and VanB-type glycopeptide resistance in enterococci: *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 45, p. 375-381.

- Baptista, M., F. Depardieu, P. Courvalin, and M. Arthur, 1996, Specificity of induction of glycopeptide resistance genes in *Enterococcus faecalis*: Antimicrobial Agents and Chemotherapy, v. 40, p. 2291-2295.
- Baptista, M., F. Depardieu, P. Reynolds, P. Courvalin, and M. Arthur, 1997, Mutations leading to increased levels of resistance to glycopeptide antibiotics in VanB-type enterococci: Molecular Microbiology, v. 25, p. 93-105.
- Barna, J. C. J., D. H. Williams, P. Strazzolini, A. Malabarba, and T. W. C. Leung, 1984, Structure and conformation of epimers derived from the antibiotic teicoplanin: Journal of Antibiotics, v. 37, p. 1204-1208.
- Beauregard, D. A., D. H. Williams, M. N. Gwynn, and D. J. C. Knowles, 1995, Dimerization and membrane anchors in extracellular targeting of vancomycin group antibiotics: Antimicrobial Agents and Chemotherapy, v. 39, p. 781-785.
- Belley, A., G. A. McKay, F. F. Arhin, I. Sarmiento, S. Beaulieu, I. Fadhil, T. R. Parr, Jr., and G. Moeck, 2010, Oritavancin Disrupts Membrane Integrity of *Staphylococcus aureus* and Vancomycin-Resistant Enterococci To Effect Rapid Bacterial Killing: Antimicrobial Agents and Chemotherapy, v. 54, p. 5369-5371.
- Binda, E., F. Marinelli, and G. L. Marcone, 2014, Old and New Glycopeptide Antibiotics: Action and Resistance, Italy.
- Bugg, T. D. H., G. D. Wright, S. Dutkamalen, M. Arthur, P. Courvalin, and C. T. Walsh, 1991, Molecular-basis for vancomycin resistance in *Enterococcus-faecium* BM4147 - biosynthesis of a depsipeptide peptidoglycan precursor by vancomycin resistance proteins VanH and VanA: Biochemistry, v. 30, p. 10408-10415.
- Candiani, G., M. Abbondi, M. Borgonovi, G. Romano, and F. Parenti, 1999, In-vitro and in-vivo antibacterial activity of BI 397, a new semi-synthetic glycopeptide antibiotic: Journal of Antimicrobial Chemotherapy, v. 44, p. 179-192.
- Chang, S., D. M. Sievert, J. C. Hageman, M. L. Boulton, F. C. Tenover, F. P. Downes, S. Shah, J. T. Rudrik, G. R. Pupp, W. J. Brown, D. Cardo, S. K. Fridkin, and S. Vancomycin-Resistant, 2003, Infection with vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* containing the vanA resistance gene: New England Journal of Medicine, v. 348, p. 1342-1347.
- Chen, A. Y., M. J. Zervos, and J. A. Vazquez, 2007, Dalbavancin: a novel antimicrobial: International Journal of Clinical Practice, v. 61, p. 853-863.
- Corrigan, R. M., and T. J. Foster, 2009, An improved tetracycline-inducible expression vector for *Staphylococcus aureus*: Plazmid, v. 61, p. 126-129.

- Courvalin, P., 1990, RESISTANCE OF ENTEROCOCCI TO GLYCOPEPTIDES: Antimicrobial Agents and Chemotherapy, v. 34, p. 2291-2296.
- Cui, L. Z., A. Iwamoto, J. Q. Lian, H. M. Neoh, T. Maruyama, Y. Horikawa, and K. Hiramatsu, 2006, Novel mechanism of antibiotic resistance originating in vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus*: Antimicrobial Agents and Chemotherapy, v. 50, p. 428-438.
- Dengler, V., P. S. Meier, R. Heusser, B. Berger-Baechli, and N. McCallum, 2011, Induction kinetics of the *Staphylococcus aureus* cell wall stress stimulon in response to different cell wall active antibiotics: BMC Microbiology, v. 11.
- Depardieu, F., M. Kolbert, H. Pruul, J. Bell, and P. Courvalin, 2004, VanD-type vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis*: Antimicrobial Agents and Chemotherapy, v. 48, p. 3892-3904.
- Depardieu, F., I. Podglajen, R. Leclercq, E. Collatz, and P. Courvalin, 2007, Modes and modulations of antibiotic resistance gene expression: Clinical Microbiology Reviews, v. 20, p. 79-+.
- Dubrac, S., I. G. Boneca, O. Poupel, and T. Msadek, 2007, New insights into the WalK/WalR (YycG/YycF) essential signal transduction pathway reveal a major role in controlling cell wall metabolism and biofilm formation in *Staphylococcus aureus*: Journal of Bacteriology, v. 189, p. 8257-8269.
- Eliopoulos, G. M., and C. T. Eliopoulos, 1988, Antibiotic combinations: should they be tested?: Clinical microbiology reviews, v. 1, p. 139-56.
- Gagnon, S., S. Levesque, B. Lefebvre, A.-M. Bourgault, A.-C. Labbe, and M. Roger, 2011, VanA-containing *Enterococcus faecium* susceptible to vancomycin and teicoplanin because of major nucleotide deletions in Tn1546: Journal of Antimicrobial Chemotherapy, v. 66, p. 2758-2762.
- Gao, Y., 2002, Glycopeptide antibiotics and development of inhibitors to overcome vancomycin resistance: Natural Product Reports, v. 19, p. 100-107.
- Ge, M., Z. Chen, H. R. Onishi, J. Kohler, L. L. Silver, R. Kerns, S. Fukuzawa, C. Thompson, and D. Kahne, 1999, Vancomycin derivatives that inhibit peptidoglycan biosynthesis without binding D-Ala-D-Ala: Science, v. 284, p. 507-511.
- Hafer, C., Y. Lin, J. Kornblum, F. D. Lowy, and A.-C. Uhlemann, 2012, Contribution of Selected Gene Mutations to Resistance in Clinical Isolates of Vancomycin-Intermediate *Staphylococcus aureus*: Antimicrobial Agents and Chemotherapy, v. 56, p. 5845-5851.

- Handwerger, S., M. J. Pucci, and A. Kolokathis, 1990, Vancomycin resistance is encoded on a pheromone response plasmid in *Enterococcus-faecium* 228: Antimicrobial Agents and Chemotherapy, v. 34, p. 358-360.
- Heikens, E., M. J. M. Bonten, and R. J. L. Willems, 2007, Enterococcal surface protein esp is important for biofilm formation of *Enterococcus faecium* E1162: Journal of Bacteriology, v. 189, p. 8233-8240.
- Higgins, D. L., R. Chang, D. V. Debabov, J. Leung, T. Wu, K. A. Krause, E. Sandvik, J. M. Hubbard, K. Kaniga, D. E. Schmidt, Q. F. Gao, R. T. Cass, D. E. Karr, B. M. Benton, and P. P. Humphrey, 2005, Telavancin, a multifunctional lipoglycopeptide, disrupts both cell wall synthesis and cell membrane integrity in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: Antimicrobial Agents and Chemotherapy, v. 49, p. 1127-1134.
- Hong, H. J., M. I. Hutchings, L. M. Hill, and M. J. Buttner, 2005, The role of the novel Fem protein VanK in vancomycin resistance in *Streptomyces coelicolor*: Journal of Biological Chemistry, v. 280, p. 13055-13061.
- Hong, H. J., M. I. Hutchings, J. M. Neu, G. D. Wright, M. S. B. Paget, and M. J. Buttner, 2004, Characterization of an inducible vancomycin resistance system in *Streptomyces coelicolor* reveals a novel gene (vanK) required for drug resistance: Molecular Microbiology, v. 52, p. 1107-1121.
- Howden, B. P., J. K. Davies, P. D. Johnson, T. P. Stinear, and M. L. Grayson, 2010, Reduced vancomycin susceptibility in *Staphylococcus aureus*, including vancomycin-intermediate and heterogeneous vancomycin-intermediate strains: resistance mechanisms, laboratory detection, and clinical implications: Clin Microbiol Rev, v. 23, p. 99-139.
- Kuroda, M., H. Kuroda, T. Oshima, F. Takeuchi, H. Mori, and K. Hiramatsu, 2003, Two-component system VraSR positively modulates the regulation of cell-wall biosynthesis pathway in *Staphylococcus aureus*: Molecular Microbiology, v. 49, p. 807-821.
- Kuzin, A. P., T. Sun, J. Jorzak-Baillass, V. L. Healy, C. T. Walsh, and J. R. Knox, 2000, Enzymes of vancomycin resistance: the structure of D-alanine-D-lactate ligase of naturally resistant *Leuconostoc mesenteroides*: Structure with Folding & Design, v. 8, p. 463-470.
- Lebreton, F., F. Depardieu, N. Bourdon, M. Fines-Guyon, P. Berger, S. Camiade, R. Leclercq, P. Courvalin, and V. Cattoir, 2011, D-Ala-D-Ser VanN-Type Transferable

- Vancomycin Resistance in *Enterococcus faecium*: Antimicrobial Agents and Chemotherapy, v. 55, p. 4606-4612.
- Lefort, A., M. Arthur, F. Depardieu, F. Chau, C. Pouzet, P. Courvalin, and B. Fantin, 2004, Expression of glycopeptide-resistance gene in response to vancomycin and teicoplanin in the cardiac vegetations of rabbits infected with VanB-type *Enterococcus faecalis*: Journal of Infectious Diseases, v. 189, p. 90-97.
- Lessard, I. A. D., and C. T. Walsh, 1999, VanX, a bacterial D-alanyl-D-alanine dipeptidase: Resistance, immunity, or survival function?: Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, v. 96, p. 11028-11032.
- Marahiel, M. A., and L. O. Essen, 2009, Nonribosomal peptide synthetases: mechanistic and structural aspects of essential domains: Complex Enzymes in Microbial Natural Product Biosynthesis, Part a: Overview Articles and Peptides, v. 458, p. 337-+.
- Nelson, J. L., K. C. Rice, S. R. Slater, P. M. Fox, G. L. Archer, K. W. Bayles, P. D. Fey, B. N. Kreiswirth, and G. A. Somerville, 2007, Vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus* strains have impaired acetate catabolism: Implications for polysaccharide intercellular adhesin synthesis and autolysis: Antimicrobial Agents and Chemotherapy, v. 51, p. 616-622.
- Nicas, T. I., C. Y. E. Wu, J. N. Hobbs, D. A. Preston, and N. E. Allen, 1989, Characterization of vancomycin resistance in *Enterococcus-faecium* and *Enterococcus-faecalis*: Antimicrobial Agents and Chemotherapy, v. 33, p. 1121-1124.
- Novotna, G., V. Adamkova, J. Janata, O. Melter, and J. Spizek, 2005, Prevalence of resistance mechanisms against macrolides and lincosamides in methicillin-resistant coagulase-negative staphylococci in the Czech Republic and occurrence of an undefined mechanism of resistance to lincosamides: Antimicrobial Agents and Chemotherapy, v. 49, p. 3586-3589.
- Novotna, G., C. Hill, K. Vincent, C. Liu, and H.-J. Hong, 2012, A Novel Membrane Protein, VanJ, Conferring Resistance to Teicoplanin: Antimicrobial Agents and Chemotherapy, v. 56, p. 1784-1796.
- Patti, G. J., S. J. Kim, T.-Y. Yu, E. Dietrich, K. S. E. Tanaka, T. R. Parr, Jr., A. R. Far, and J. Schaefer, 2009, Vancomycin and Oritavancin Have Different Modes of Action in *Enterococcus faecium*: Journal of Molecular Biology, v. 392, p. 1178-1191.
- Pereira, P. M., S. R. Filipe, A. Tomasz, and M. G. Pinho, 2007, Fluorescence ratio imaging microscopy shows decreased access of vancomycin to cell wall synthetic sites in

- vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus*: Antimicrobial Agents and Chemotherapy, v. 51, p. 3627-3633.
- Perichon, B., and P. Courvalin, 2009, VanA-Type Vancomycin-Resistant *Staphylococcus aureus*: Antimicrobial Agents and Chemotherapy, v. 53, p. 4580-4587.
- Poole, K., 2012, Bacterial stress responses as determinants of antimicrobial resistance: Journal of Antimicrobial Chemotherapy, v. 67, p. 2069-2089.
- Pootoolal, J., M. G. Thomas, C. G. Marshall, J. M. Neu, B. K. Hubbard, C. T. Walsh, and G. D. Wright, 2002, Assembling the glycopeptide antibiotic scaffold: The biosynthesis of A47934 from *Streptomyces toyocaensis* NRRL 15009: Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, v. 99, p. 8962-8967.
- Renzoni, A., D. O. Andrey, A. Jousselin, C. Barras, A. Monod, P. Vaudaux, D. Lew, and W. L. Kelley, 2011, Whole Genome Sequencing and Complete Genetic Analysis Reveals Novel Pathways to Glycopeptide Resistance in *Staphylococcus aureus*: Plos One, v. 6.
- Reynolds, P. E., and P. Courvalin, 2005, Vancomycin resistance in enterococci due to synthesis of precursors terminating in D-Alanyl-D-Serine: Antimicrobial Agents and Chemotherapy, v. 49, p. 21-25.
- Robert, J., R. Bismuth, and V. Jarlier, 2006, Decreased susceptibility to glycopeptides in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: a 20 year study in a large French teaching hospital, 1983-2002: Journal of Antimicrobial Chemotherapy, v. 57, p. 506-510.
- Roy, R. S., P. Yang, S. Kodali, Y. S. Xiong, R. M. Kim, P. R. Griffin, H. R. Onishi, J. Kohler, L. L. Silver, and K. Chapman, 2001, Direct interaction of a vancomycin derivative with bacterial enzymes involved in cell wall biosynthesis: Chemistry & Biology, v. 8, p. 1095-1106.
- Scheffers, D. J., and M. G. Pinho, 2005, Bacterial cell wall synthesis: New insights from localization studies: Microbiology and Molecular Biology Reviews, v. 69, p. 585-+.
- Sieradzki, K., T. Leski, J. Dick, L. Borio, and A. Tomasz, 2003, Evolution of a vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus* strain in vivo: Multiple changes in the antibiotic resistance phenotypes of a single lineage of methicillin-resistant *S-aureus* under the impact of antibiotics administered for chemotherapy: Journal of Clinical Microbiology, v. 41, p. 1687-1693.
- Sletvold, H., P. J. Johnsen, O. G. Wikmark, G. S. Simonsen, A. Sundsfjord, and K. M. Nielsen, 2010, Tn1546 is part of a larger plasmid-encoded genetic unit horizontally disseminated among clonal *Enterococcus faecium* lineages: Journal of Antimicrobial Chemotherapy, v. 65, p. 1894-1906.

- Smith MA, Bidochka MJ (1998) Bacterial fitness and plasmid loss: the importance of culture conditions and plasmid size. *Canadian Journal of Microbiology* **44**: 351-355
- Stoll, V. S., A. V. Manohar, W. Gillon, E. L. A. Macfarlane, R. C. Hynes, and E. F. Pai, 1998, A thioredoxin fusion protein of VanH, a D-lactate dehydrogenase from *Enterococcus faecium*: Cloning, expression, purification, kinetic analysis, and crystallization: Protein Science, v. 7, p. 1147-1155.
- Urbášková, P. 1997. Rezistence bakterií k antibiotikům – vybrané metody. Trios, Praha.
- Uttley, A. H. C., R. C. George, J. Naidoo, N. Woodford, A. P. Johnson, C. H. Collins, D. Morrison, A. J. Gilfillan, L. E. Fitch, and J. Heptonstall, 1989, High-level vancomycin-resistant enterococci causing hospital infections: Epidemiology and Infection, v. 103, p. 173-181.
- Van Bambeke, F., 2006, Glycopeptides and glycopeptides in clinical development: A comparative review of their antibacterial spectrum, pharmacokinetics and clinical efficacy: Current Opinion in Investigational Drugs, v. 7, p. 740-749.
- Van Bambeke, F., Y. Van Laethem, P. Courvalin, and P. M. Tulkens, 2004, Glycopeptide antibiotics from conventional molecules to new derivatives: Drugs, v. 64, p. 913-936.
- Vimberg, V., J. Lenart, J. Janata, and G. B. Novotna, 2015, ClpP-independent function of ClpX interferes with telithromycin resistance conferred by Msr(A) in *Staphylococcus aureus*: Antimicrob Agents Chemother.
- Walsh, C. T., 1989, Enzymes in the D-alanine branch of bacterial-cell wall peptidoglycan assembly: Journal of Biological Chemistry, v. 264, p. 2393-2396.
- Yim, G., M. N. Thaker, K. Koteva, and G. Wright, 2014, Glycopeptide antibiotic biosynthesis: Journal of Antibiotics, v. 67, p. 31-41.
- Zhanel, G. G., F. Schweizer, and J. A. Karlowsky, 2012, Oritavancin: Mechanism of Action: Clinical Infectious Diseases, v. 54, p. S214-S219.